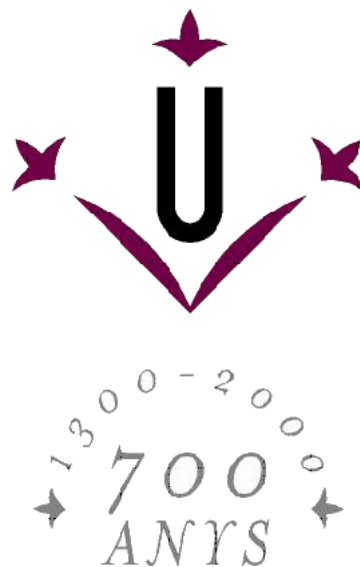


UNIVERSITAT DE LLEIDA

Facultat de Medicina

Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques



**ESTUDI DE L' APOPTOSI INDUÏDA PER INHIBIDORS
FARMACOLÒGICS DE LES CDKs. CARACTERITZACIÓ
DELS SINERGISMES AMB TAXOIDES I NUTLINA-3.**

JUDIT RIBAS I FORTUNY

2005



Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida
C./ Montserrat Roig, 2 25008 Lleida, Catalunya (Spain)

**ESTUDI DE L' APOPTOSI INDUÏDA PER INHIBIDORS
FARMACOLÒGICS DE LES CDKs. CARACTERITZACIÓ
DELS SINERGISMES AMB TAXOIDES I NUTLINA-3.**

JUDIT RIBAS I FORTUNY

Tesi PhD

Lleida, 2005

Director de tesi

Jacint Boix i Torras

A la meua família.

RESUM

L'olomoucina i la roscovitina són dos inhibidors de les cinases dependents de ciclins (CDKs) que actuen competint pel lloc d'unió de l'ATP. Presenten una alta especificitat "in vitro" davant de la CDK1, 2, 5, 7, 9 i les ERKs. Aquest perfil inhibidor els confereix unes amplies perspectives en la teràpia antitumoral. En aquest treball, hem mostrat que la línia neuroblàstica de les SH-SY5Y i la promielocítica de les HL60, morien apoptòticament en resposta a ambdós fàrmacs. Una caracterització més extensa del procés, va evidenciar que la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-X_L no conferien resistència. En canvi, la inhibició general de les caspases amb z-VAD-fmk, frenava parcialment la mort. En conseqüència, vam hipotetitzar que ens trobàvem davant d'una via extrínseca d'apoptosi, dependent de l'activació de la caspasa 8 (CASP8) o de la caspasa 10 (CASP10). Tanmateix, les CASP8/10 no s'expressen a les SH-SY5Y ja que els seus gens han estat metilats, i és més, no vam observar que es reexpressessin en resposta a l'olomoucina o la roscovitina. En conclusió, la implicació al nostre paradigma experimental d'una via extrínseca canònica d'apoptosi va ser descartada. D'altra banda, la inhibició de la síntesi de proteïnes protegia les SH-SY5Y de l'apoptosi. Curiosament, vam observar l'existència de sinergisme de rescat entre el z-VAD-fmk i, per exemple, la cicloheximida, fet que suggeria l'existència de diferents vies apoptòtiques en diferents subpoblacions del cultiu cel·lular. La manca de toxicitat del tractament amb PD98059 o UO126, dos inhibidors de la via Erk1/2, anava en contra de que la inhibició de Erk1/Erk2 fos la causa de l'apoptosi. És més, el tractament amb olomoucina i roscovitina induïa la fosforilació i subseqüent activació de les Erk1/2. Sorprenentment, al nostre model, l'iso-olomoucina, un isòmer inactiu de l'olomoucina, causava el mateixos efectes sobre les ERKs. Basant-nos en els resultats d'iso-olomoucina, vam concloure que la fosforilació de les ERKs i la seua subseqüent activació, no estaven implicats en els fenòmens d'apoptosi, proliferació i diferenciació. Finalment, vam mostrar que les SH-SY5Y diferenciades esdevenien resistents a l'olomoucina i a la roscovitina, fet que recolzava el paper de la inhibició de les CDKs en tant que esdeveniment iniciador de la cascada apoptòtica. D'altra banda, l'olomoucina i la roscovitina són cada cop més estudiats en el context de la teràpia combinatòria enfront del càncer. Als nostres treballs, hem utilitzat la R-roscovitina, un dels dos estereoisòmers de la roscovitina. La combinació amb el docetaxel (DTX) no era sinèrgica induint mort. En canvi, la R-roscovitina sensibilitzava les SH-SY5Y a l'apoptosi induïda per la nutlina-3, un nou i prometedor fàrmac inductor de la via p53.

RESUMEN

La olomoucina y la roscovitina son dos inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) cuyo mecanismo de acción es competir con el ATP por la unión a la enzima. Presentan una alta selectividad "in vitro" ante la CDK1, 2, 5, 7, 9 y las ERKs. Este perfil inhibitor les confiere amplias perspectivas en la terapia antitumoral. En este trabajo, hemos mostrado que la línea de las SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma, y la de las HL-60, derivada de una leucemia promielocítica, morían apoptoticamente en respuesta a ambos fármacos. Una caracterización más amplia del proceso apoptótico, evidenció que la expresión forzada de Bcl-2 o de Bcl-X_L no conferían resistencia ante ninguna de nuestras drogas. En cambio, sí se hacían parcialmente más resistentes cuando eran tratadas con un inhibidor general de las caspasas (z-VAD-fmk). En consecuencia, nuestra hipótesis fue que nos hallábamos ante una apoptosis por vía extrínseca iniciada por la caspasa 8 (CASP8) y/o la caspasa 10 (CASP10). Curiosamente, dichas caspasas no se expresan en las SH-SY5Y debido a un proceso de metilación génica, y pudimos ver que el tratamiento tampoco inducía su reexpresión. En conclusión, descartamos que las SH-SY5Y iniciasen una vía extrínseca canónica en respuesta a nuestras drogas. Por otro lado, la inhibición de la síntesis proteica en nuestro modelo frenaba la apoptosis. Es más, el z-VAD-fmk junto con, por ejemplo, la cicloheximida, presentaban un sinergismo en el rescate. Esto sugería la coexistencia en nuestro cultivo de distintas subpoblaciones capaces de iniciar diferentes vías apoptóticas. El tratamiento con PD98059 o UO126, dos inhibidores de la vía de Erk1/2, se mostró inocuo a la hora de inducir muerte, por lo cual descartamos que la inhibición de Erk1/2 fuera la responsable de la apoptosis. Sorprendentemente, el estudio del estado de fosforilación de Erk1/2, nos permitió constatar que éstas se activaban en respuesta a la olomoucina y la roscovitina. Más sorprende aún, resultó el hecho que la iso-olomoucina, un isómero inactivo de la olomoucina, causara los mismos efectos sobre Erk1/2. Esto nos permitió afirmar que no existía correlación entre la fosforilación de Erk1/2 y la inhibición de las CDKs. En base principalmente a los resultados de la iso-olomoucina, pudimos afirmar que la fosforilación de las ERKs y su subsiguiente activación, no se correlacionaban con la apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Finalmente, evidenciamos que las SH-SY5Y diferenciadas se volvían resistentes a la olomoucina y a la roscovitina, hecho a favor de que la inhibición de las CDKs fuera el evento iniciador de la cascada apoptótica. Alternativamente, la olomoucina y la roscovitina están siendo cada vez más estudiadas en el contexto de la terapia combinatoria frente al cáncer. En nuestros experimentos, utilizamos también la R-roscovitina, uno de los dos estereoisómeros de la roscovitina. En su combinación con el docetaxel (DTX), no observamos sinergismo. El caso contrario sucedió cuando fue administrada junto a la nutlina-3, un nuevo y prometedor inductor de p53. Vimos como la R-roscovitina sensibilizaba las SH-SY5Y a la apoptosis inducida por la nutlina-3.

RESUME

L'olomoucine et la roscovitine sont deux inhibiteurs des kinases dépendantes de cyclines (CDKs) qui agissent par inhibition compétitive via le site d'union de l'ATP. Son profil inhibiteur est très prometteur dans le traitement du cancer. Présentent une grande spécificité "in vitro" face aux CDK1, 2, 5, 7, 9 et aux ERKs. Dans ce travail, nous avons démontré que la lignée neuroblastique SH-SY5Y et la promyélocytique HL-60, mouraient apoptotiquement en réponse à ces drogues. Une plus large caractérisation de l'apoptose dans les SH-SY5Y a mis en évidence que la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-X_L ne se traduisait par une augmentation de la résistance au traitement. Cependant, le traitement avec un inhibiteur général des caspases (z-VAD-fmk) présentait des effets protecteurs partiels. Au vu de ces résultats, notre hypothèse reposait sur l'implication d'une voie extrinsèque d'apoptose qui dépendait de l'activation de la caspase 8 (CASP8) ou de la caspase 10 (CASP10). Néanmoins, la méthylation des gènes des CASP8 et 10 dans les SH-SY5Y empêche l'expression de ces protéines et, plus encore, l'olomoucine et la roscovitine n'induisaient pas la réexpression de ces caspases. En conclusion, l'apoptose par une voie extrinsèque classique pouvait être écartée dans notre paradigme expérimental. D'un autre côté, les inhibiteurs de la synthèse des protéines protégeaient les SH-SY5Y de l'apoptose. De manière surprenante, on avait observé l'existence de synergie dans la protection avec z-VAD-fmk et, par exemple, le cycloheximide. Ce fait suggérait la présence de différentes sous-populations cellulaires dans les SH-SY5Y qui engageaient des voies apoptotiques distinctes. Le manque d'effets toxiques du PD98059 ou UO126, deux inhibiteurs de la voie d'Erk1/2, avait écarté l'inhibition de Erk1/Erk2 comme la responsable de l'apoptose. Plus encore, l'olomoucine et la roscovitine induisaient la phosphorylation et subséquente activation d'Erk1/Erk2. De manière surprenante, l'iso-olomoucine, un isomère inactif de l'olomoucine, induisait aussi la phosphorylation et l'activation dans notre modèle cellulaire. Sur base de ces résultats, nous avons conclu que la phosphorylation d'Erk1/Erk2 et son activation, n'avait pas un corrélat avec l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Finalement, nous avons mis en évidence que les SH-SY5Y différenciées devenaient résistantes à l'olomoucine ou à la roscovitine. Ce fait suggérait que l'inhibition des CDKs avait un rôle dans le déclenchement de l'apoptose. Alternativement, l'olomoucine et la roscovitine sont de plus en plus étudiées dans le contexte de la thérapie combinatoire face au cancer. J'ai utilisé la R-roscovitine dans nos expériences, l'un des deux stéréoisomères de la roscovitine. La combinaison avec le docétaxel (DTX) n'avait pas des effets létaux synergiques, en revanche la R-roscovitine sensibilisait les SH-SY5Y à l'apoptose par la nutline-3, un nouvel agent inducteur de la voie p53.

SUMMARY

Olomoucine and roscovitine are two ATP-competing inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) displaying a promising profile as anticancer agents. They exhibit "in vitro" selectivity against CDK1, 2, 5, 7, 9 and ERKs. In this work, we have showed that SH-SY5Y neuroblastoma and HL-60 promyelocytic cell lines died by apoptosis in response to both drugs. An extensive characterization of the process in SH-SY5Y cells has shown that neither Bcl-2 nor Bcl-X_L overexpression conferred any resistance to both drugs. However, a partial protective effect was detected when cells were treated with a general inhibitor of caspases (z-VAD-fmk). Therefore, the involvement of an extrinsic pathway mediated by Caspase 8 (CASP8) or Caspase 10 (CASP10) could be hypothesised. CASP8/10 are known not to be expressed in SH-SY5Y because of gene silencing and we have found no re-expression was induced by either olomoucine or roscovitine. In conclusion, a canonical extrinsic pathway has been discarded in SH-SY5Y cells facing these drugs. On the other hand, protein synthesis inhibitors protected SH-SY5Y cells from apoptosis. Interestingly, a synergism in cell protection was observed between z-VAD-fmk and, for instance cycloheximide. This suggested different apoptotic pathways occurring in distinct subpopulations of the cell culture. No lethality was found when cells were treated with either PD98059 or UO126 drugs, two inhibitors of the Erk1/2 pathway, thus discarding, this inhibition as the cause of apoptosis. Furthermore, olomoucine and roscovitine induced the phosphorylation and subsequent activation of Erk1/2 proteins. Interestingly, iso-olomoucine, an inactive isomer of olomoucine, caused the same effect in our cell model. Therefore, no correlation existed between Erk1/2 phosphorylation and CDK inhibition. Based mainly on the iso-olomoucine results, we concluded that phosphorylation and subsequent activation of Erk1/2 were not involved in apoptosis, proliferation and differentiation of the cells. Finally, we show that differentiated SH-SY5Y cells became resistant to either olomoucine or roscovitina, thus providing support for CDK inhibition as the initiating event of these apoptotic processes. Olomoucine and roscovitine are being increasingly studied in the context of combinatorial therapy for cancer. In our studies, we have also used R-roscovitine, the right stereoisomer of roscovitine. No synergism was found when combined with docetaxel (DTX). On the contrary, R-roscovitine sensitized SH-SY5Y cells to nutlin-3 induced apoptosis, being nutlin-3 a new promising inductor of the p53 functions.

En tu m'aprenc i em desaprenc en tu,
I aquest vaivé tranquil és el que em du
fins al centre més pur del propi jo.

Miquel Martí i Pol, del poema "*Amb l'Ombra Dòcil*".

I – ÍNDEX

Índex

I ÍNDEX	i
Índex	iii
Índex de figures	vii
Índex de taules	xi
II PRÒLEG	13
III INTRODUCCIÓ	19
1 CICLE CEL·LULAR.	21
1.1 ELS <i>CHECKPOINTS</i>	23
1.2 LES CDKs	25
1.2.1 La CDK1	26
1.2.2 La CDK2	29
1.2.3 Les CDKs amb activitat transcripcional	31
1.2.4 La CDK5	35
2 INHIBIDORS FARMACOLÒGICS DE CDKs.	37
2.1 ELS DERIVATS PURÍNICS	40
2.1.1 Aparició i estudis cristal·logràfics	40
2.1.2 Estudis de l'eficàcia enfront de la selectivitat	41
2.2 OLOMOUCINA I ROSCOVITINA	45

2.2.1	Introducció històrica	45
2.2.2	Efectes cel·lulars	48
2.2.3	Perspectives terapèutiques dels inhibidors de CDKs	50
3	APOPTOSI	53
3.1	LES CASPASES	54
3.1.1	Les caspases com proteases	57
3.1.2	Les caspases iniciadores	62
3.2	LA VIA EXTRÍNSECA VERSUS LA VIA INTRÍNSECA.	63
3.3	VIA EXTRÍNSECA.	63
3.3.1	Les CASPS 8 i 10	64
3.3.2	La CASP2	69
3.4	LA VIA INTRÍNSECA	69
3.4.1	Els membres de la família de Bcl-2	70
3.4.2	La permeabilització del mitocondri	73
3.4.3	Apoptosoma	75
3.4.3.1	APAF-1	75
3.4.3.2	Citocrom c	78
3.4.4	AIF	81
3.5	APOPTOSI INICIADA EN ALTRES ORGÀNULS.	83
3.6	INHIBIDORS FISIOLÒGICS D'APOPTOSI: SURVIVINA	86
3.6.1	Expressió de la survivina	89
3.6.2	Localització de la survivina	90
3.6.3	Regulació dels nivells de survivina	91
3.6.4	Regulació de l'apoptosi per survivina	92
4	APOPTOSI I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	95
5	LA CATÀSTROFE MITÒTICA	103

6	P53, “LE GARDIEN DU GENOME ”	107
6.1	MECANISMES D’ACTIVATION DE P53	108
6.1.1	L’oncoprotéine MDM2	108
6.1.2	Les modifications post-traductionnelles	109
6.2	P53 ET APOPTOSE.	111
6.3	P53 CHEZ LE NEUROBLASTOME	113
6.4	P53 ET SA FAMILLE	114
6.5	EFFETS DES INHIBITEURS DE CDKs SUR P53	114
7	AUTRES COMPOSES ANTITUMORAUX.	117
7.1	LES NUTLINES	117
7.2	LES TOXIQUES DES MICROTUBULES.	119
7.3	APPROCHES THERAPEUTIQUES ANTITUMORALES.	122
7.3.1	Selectivité par synergie	122
7.3.2	Thérapie séquentielle	125
IV	RESULTATS	129
8	CARACTERIZATION OF APOPTOSIS INDUCED BY OLOMOUCINE AND ROSCOVITINE	131
8.1	ARTICLE 1.	135
8.2	ARTICLE 2.	153
8.3	ARTICLE 3.	163
8.4	L’OLOMOUCINA I LA ROSCOVITINA NO INDUEIXEN CANVIS EN ELS NIVELLS D’EXPRESSION DE FAS/FAS-L	186
8.5	L’OLOMOUCINA I LA ROSCOVITINA INDUEIXEN APOPTOSI A LES HL-60	188
9	ANALYSIS OF THE SYNERGISM BETWEEN R-ROSCOVITINE AND OTHER ANTINEOPLASIC DRUGS.	191
9.1	ARTICLE 4	193

9.2 THERAPIES SEQUENTIELLES PAR LES TOXIQUES DES MICROTUBULES ET LES INHIBITEURS DES CDKs.	209
9.2.1 MATERIEL ET METHODES	209
9.2.2 RESULTATS	210
V DISCUSSION	217
10 LA IDENTIFICACIÓ DE LA CASPASA X.	219
11 IDENTIFICACIÓ DE LA CDK DIANA D'AQUESTS FÀRMACS I DELS MECANISMES SUBSEGÜENTS QUE DUEN A L'APOPTOSI	225
12 DIANES ALTERNATIVES	229
VI REFERÈNCIES	231
VII ABREVIATURES	251
VIII AGRAÏMENTS	257

Índex de figures

1.1	Esquema de les onades d'assemblatge de les CDKs i les ciclines durant el cicle cel·lular. . .	23
1.2	Activació de p53 a través dels <i>checkpoints</i>	25
1.3	Esquema de la regulació del MPF durant la mitosi (Castedo et al., 2004)	28
1.4	Regulació de l'activitat CDK1 i CDK2 (Bashir i Pagano, 2005).	32
1.5	Mecanismes de regulació de la CDK7	34
2.1	Mapa del <i>kinome</i> representant les 518 cinases segons Maning et al., (2002)	38
2.2	Determinació de la selectivitat d'un compost pel <i>yeast triple hybrid system</i> segons Becker et al., (2004).	43
2.3	Mapa del <i>kinome</i> representant les 113 proteïna-cinases estudiades en assajos de competició a través del lloc d'unió de l'ATP segons Fabian et al., (2005).	44
2.4	Mapa del <i>kinome</i> representant les 113 proteïna-cinases estudiades en assajos de competició a través del lloc d'unió de l'ATP per la R-roscovitina, el flavopiridol i l'estaurosporina segons Fabian et al., (2005).	45
2.5	Estructura de diversos compostos inhibidors de CDKs segons Meijer i Raymond (2003). . .	47
2.6	Perspectives terapèutiques dels inhibidors de CDKs.	52
3.1	Esquema de l'estructura de les caspases iniciadores i efectores	55
3.2	Tetràmer de caspases.	58
3.3	Cascada de caspases.	58
3.4	Aproximació experimental per a distingir les vies apoptòtiques canòniques.	65
3.5	Comparació de les estructures de c-FLIP, FADD, les CASP8 i 10.	66
3.6	Model de les diferents funcions de c-FLIP _L en funció dels seus nivells d'expressió.	68
3.7	Llocs de tall de Bid (Stoka et al, 2001)	71

3.8	La família de Bcl-2.	72
3.9	Mecanismes de permeabilització de la membrana mitocondrial externa (OMM) i alliberament del citocrom c.	74
3.10	Dominis en l'estructura de Apaf-1	76
3.11	Formació de l'apoptosoma i activació de les CASPs després de la sortida del Cyt c (Jiang i Wang, 2004).	77
3.12	Model d'activació de la proCASP9 a l'apoptosoma.	78
3.13	Mecanismes de permeabilització de la membrana amb intervenció de la cardiolipina.	79
3.14	Mecanisme d'acció de XIAP bloquejant CASP3 i CASP9.Fre del bloqueig per Smac (Fesik i Shi., 2001).	87
3.15	Estructura dels IAPs	88
3.16	Paper hipotètic de la survivina i de les proteïnes amb qui interactua en el control de l'apoptosi.	94
6.1	P53 dans la régulation de l'apoptose.	112
7.1	Structure de la famille des nutlines.	118
7.2	Structure chimique du paclitaxel ou taxol (Mulzer and Martin, 2004).	121
7.3	Structure chimique de l'epothilone B (Mulzer and Martin, 2004).	122
7.4	Identification de cibles compatibles pour le dessein rationnel des thérapies combinatoires.	124
8.1	Olomoucine and roscovitine used at lethal or sublethal concentrations are not inducing SH-SY5Y differentiation.	132
8.2	Proposed SH-SY5Y subpopulations based on CHX and zVADfmk protective effects.	133
8.3	Olomoucine and Roscovitine do not trigger Caspase 8/10 zymogen expression in SH-SY5Y cells.	161
8.4	Olomoucine and Roscovitine do not trigger caspase 8/10 proteolytic activity in SH-SY5Y cells.	162
8.5	Els nivells de proteïna del sistema Fas i Fas-L no varien durant el tractament de les SH-SY5Y amb olomoucina.	187
8.6	L'olomoucine i la roscovitina indueixen mort apoptòtica de forma dosi dependent a les HL-60.	189

8.7	Efectes del z-VAD-fmk sobre la mort de l'olomoucina i la roscovitina a les HL-60	190
9.1	Mort cellulaire induite par les inhibiteurs des microtubules.	212
9.2	Effets de la R-roscovitine et du flavopiridol sur la viabilité cellulaire des SH-SY5Y.	213
9.3	La séquence de traitement DTX suivi de la R-roscovitine à des doses aussi élevées que 10 μ M ne présente pas de différences de diminution de la viabilité.	214
9.4	Effets toxiques du DTX.	215
10.1	Esquema de les possibles vies responsables de la mort cel·lular en les SH-SY5Y tractades amb olomoucina o roscovitina.	219
10.2	Model de la diferent afinitat dels <i>BH3 only</i> per diversos membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 (Chen et al., 2005).	223

Índex de taules

1	Classificació dels fàrmacs inhibidors de CDKs.	18
3.1	Classificació i característiques de les caspases.	55
3.2	Substrats de caspases segons Fischer et al. (2003)	59
9.1	Étude de la synergie induite par la thérapie séquentielle entre le docétaxel et le flavopiridol.213	
11.1	Taula de les IC ₅₀ (μ M) de l'olomoucina i la roscovitina enfront de les seues principals dianes.	225

II – PRÒLEG

ELS TUMORS I LA TERÀPIA ANTITUMORAL.

Els països del mal anomenat “primer món” han proporcionat una major esperança de vida a la seua població. En aquest procés, la incidència de les malalties associades a la vellesa ha sofert una explosió. Una d’aquestes malalties és el càncer, també anomenat neoplàsia maligna o tumor maligne. Considerar que l’augment dels casos de càncer és degut només a l’envelliment demogràfic seria simplista. Molt probablement altres factors, com per exemple mediambientals o fins i tot alimentaris, estan contribuint en l’augment de les neoplàsies malignes. Les previsions auguren que una de cada cinc persones a Europa o Estats Units morirà de càncer. El càncer és una malaltia multifactorial en la que es produeix una multiplicació i disseminació incontrolada dins de l’organisme de formes anormals de les pròpies cèl·lules. Les principals característiques de les cèl·lules canceroses que les diferencien de les cèl·lules sanes, són:

1. La proliferació incontrolada.
2. L’alteració de la seua funció degut als trastorns en la capacitat per diferenciar-se.
3. La capacitat d’envair els teixits circumdants.
4. La capacitat de produir metàstasi.

Una cèl·lula normal es converteix en cancerosa degut a l’acumulació de mutacions heretades o adquirides a l’ADN. El desenvolupament del càncer és un procés complex que consta de múltiples etapes, entre elles una sèrie de canvis genètics que es poden acompanyar de canvis epigenètics. Els canvis epigenètics consisteixen, per exemple, en modificacions de l’estat de metilació de l’ADN o en modificacions post-traduccionals de les histones. Aquests esdeveniments poden ser fruit de l’acció hormonal, dels efectes de cocarcinògens, de promotors tumorals, etc. Els canvis epigenètics poden actuar com detonants del procés tumoral en el context de certes mutacions genètiques, però no són suficients per causar un procés tumoral.

Les dues categories principals de canvis genètics que originen un tumor són:

1. Activació de protooncògens a oncògens.
2. Inactivació dels gens supressors de tumors.

Aquests dos tipus de canvis genètics es poden traduir en una proliferació incontrolada a través de les alteracions de:

1. Expressió de factors de creixement i/o dels seus receptors.
2. Alteracions en les vies dels factors de creixement (transductors citosòlics i nuclears).

3. Reguladors del cicle cel·lular (per exemple ciclines, CKIs,...).
4. Mecanismes apoptòtics.
5. Expressió de la telomerasa.
6. Neoangiogènesi associada al tumor.

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular que es diferencia de la necrosi per no produir un procés inflamatori ja que el contingut intracel·lular no és alliberat al medi extracel·lular. L'apoptosi és, en termes generals, una mort "silenciosa" per a l'organisme i per aquest motiu la farmacologia antitumoral té un gran interès per trobar agents antitumorals inductors d'aquest tipus de mort. Malauradament en molts casos les cèl·lules tumorals presenten freqüentment mutacions en les vies apoptòtiques i la seua susceptibilitat als tractaments antitumorals és inferior a la dels seues homòlogues sanes. Alternativament, un punt que ha suscitat gran interès en terapèutica és aconseguir que els agents antitumorals siguin cada cop més selectius per les cèl·lules tumorals. L'avenç en la terapèutica antitumoral depèn en gran part d'un coneixement detallat de la patologia a nivell molecular. L'aparició de fàrmacs com el mesilat d'imatinitib (Gleevec® és el seu nom comercial) han suposat un pas en aquest sentit. El Gleevec® inhibeix la cinasa Abl que està constitutivament activa en les cèl·lules de leucèmia mieloide crònica. Aquesta inhibició interromp la senyal de supervivència que passa a través de la cinasa i provoca la mort de les cèl·lules tumorals. S'espera que el coneixement del context molecular d'altres tumors permeti el disseny de nous fàrmacs amb una filosofia d'acció semblant a la del Gleevec. Els agents antitumorals poden exercir la seua funció gràcies a la seua activitat com citocides, citostàtics o diferenciadors. Els fàrmacs citotòxics o citocides indueixen la mort de la cèl·lula. Molts dels fàrmacs citocides dels que es disposa en l'actualitat són específics per a les cèl·lules que s'estan dividint ja que estan dirigits a elements que intervenen en la replicació cel·lular o àdhuc al propi ADN. Això fa que els teixits amb major capacitat proliferativa siguin més sensibles als efectes tòxics d'aquests fàrmacs. En aquest sentit, produeixen freqüentment les següents reaccions adverses:

1. Toxicitat sobre la medul·la òssia (mielodepressió) amb una reducció de la producció de leucòcits (leucopènia), eritròcits (anèmia), etc.
2. Alteració de la cicatrització de les ferides.
3. Pèrdua del cabell (alopècia).
4. Lesions en l'epiteli digestiu.
5. Trastorns del creixement en nens.

6. Esterilitat.

7. Teratogenicitat.

Els fàrmacs citostàtics actuen pròpiament aturant el cicle cel·lular i consegüentment, frenen l'augment de la massa tumoral. Fàrmacs antitumorals amb un mecanisme típicament citostàtic, són els antimetabòlits, com per exemple el metotrexat o el 5-fluorouracil. Algun d'aquests fàrmacs a més d'interrompre la replicació de l'ADN, indueixen mort cel·lular.

Els fàrmacs diferenciadors pretenen aprofitar la capacitat per diferenciar-se que certs tipus tumorals continuen mantenint; per exemple, l'àcid retinoic en el tractament del neuroblastoma o la progesterona en el tractament de l'adenocarcinoma endometrial.

L'olomoucina i la roscovitina són dos compostos sintètics derivats de l'ATP que competeixen amb aquest pel·lloc d'unió a la cinasa. Malgrat que pel seu mecanisme d'acció es podria pensar que presenten un ampli ventall d'inhibició, s'ha vist que això no és així. De totes les cinases estudiades fins ara, aquests compostos presenten una elevada especificitat només per algunes de les CDKs, concretament per les CDK1, 2, 5 i 7, mentre que són pràcticament inactius sobre les CDKs de G1, CDK4 i 6. Aquest perfil d'inhibició s'ha de revisar periòdicament degut a l'incorporació de noves cinases als panells de selectivitat, a les dades aportades per l'estudi de les cromatografies d'afinitat, etc. Aquests fàrmacs, que d'entrada podrien presentar efectes citostàtics, són al mateix temps bons inductors d'apoptosi i, per tant, actuen també com citocides. Per exemple el CYC202, l'estereoisòmer R de la roscovitina, ha estat utilitzat en humans i ha arribat a la fase II d'assajos clínics (Senderowicz, 2004). Encara que el seu mecanisme d'acció sigui conegut, s'ignora quina és la cadena de successos que porten a l'activació de la cascada apoptòtica. Aquest darrer punt ha estat l'objectiu central d'aquesta tesi.

Basada en una revisió de Sausville (2002), proposem la següent classificació dels inhibidors farmacològics de CDKs, amb un mecanisme d'acció de competició pel·lloc d'unió de l'ATP a la cinasa.

Taula 1. Classificació dels fàrmacs inhibidors de CDKs.

INHIBIDORS FARMACOLÒGICS DE CDKS
Inhibidors no específics
Estaurosporina
UCN-01
Inhibidors específics
• Primera generació (CDK1, 2, 4, 6, 9)
Flavopiridol
• Segona generació (CDK1, 2, 5, 7)
Olomoucina
Roscovitina
Purvalanol
Butirolactona
Paulones
• Tercera generació
Tio/oxoflavonoids (CDK1?)
Oxindols (CDK2?)
Aminotiazols (CDK4?)
Benzocarbazols (CDK4?)

III – INTRODUCCIÓ

CICLE CEL·LULAR.

El nom de cicle cel·lular fa referència al conjunt d'esdeveniments necessaris per a la divisió de la cèl·lula. En l'organisme d'un humà adult 20 milions de cèl·lules de les 10^{13} existents, entren cada segon en un cicle de divisió cel·lular. El cicle cel·lular és un procés general que afecta a tota la cèl·lula i que ha d'ésser regulat en l'espai i el temps. Requereix de la coordinació de diferents processos, com per exemple: el cicle cromosòmic, que consisteix en la replicació, condensació i segregació de l'ADN de forma paral·lela a la síntesi i unió de les proteïnes associades al cromosoma; la separació citoplasmàtica, que requereix de la formació del fus mitòtic i l'acció dels microtúbuls entre d'altres processos; la replicació i migració dels orgànuls, la morfogènesi del citoesquelet, la formació de membranes, el manteniment de processos cel·lulars com la síntesi proteica i de l'ARN, etc.

La progressió a través del cicle cel·lular és unidireccional i s'estructura en fases que s'han de completar perquè es pugui iniciar la següent. El cicle cel·lular eucariota es divideix en quatre fases. Durant la fase S (o fase de síntesi) es replica l'ADN i durant la M (fase de mitosi) es segreguen les cromàtides. En la majoria de cèl·lules eucariotes la fase S i la M estan separades per uns intervals (*gap* en anglès) anomenats G; la fase G1 es troba abans de la replicació de l'ADN i la G2 abans de la fase M.

La coordinació acurada de les anteriors fases és crítica per a la progressió del cicle cel·lular però addicionalment, serveix per permetre una aturada efectiva del cicle sota determinades condicions, per exemple el dany a l'ADN o l'estrès cel·lular. Alternativament, un mal funcionament de la maquinària de cicle pot dur la cèl·lula a un creixement incontrolat, principal característica d'un procés neoplàsic.

La progressió i transició entre les diferents fases del cicle cel·lular es realitza a través dels complexos formats per dues famílies de proteïnes, les ciclins i les CDKs. Les successives onades d'assemblatge i activació dels complexos formats entre les CDKs i les ciclins, estan acuradament regulades per modificacions post-traduccionals i translocacions intracel·lulars. Al mateix temps estan subjectes a la regulació pels mecanismes de *checkpoint* (veieu l'apartat 1.1) que vetllen perquè cada fase sigui completada correctament.

III – INTRODUCCIÓ

Un breu resum dels passos a seguir en un cicle cel·lular estàndard seria el següent: al principi i fins a mitjans de la fase G1, les senyals extracel·lulars regulen l'activació de les CDKs de G1 principalment a través de l'associació a la seua ciclina (per exemple, CDK4/ciclina D1 o CDK6/ciclina D3). Un cop aquests complexos són actius, fosforilen la proteïna Rb juntament amb altres membres d'aquesta família de *pocket proteins*. Aquesta fosforilació és inhibidora de la funció de Rb que actua segregant algunes desacetilases d'histones i els factors de transcripció E2F i DP1. El seu alliberament implica, per tant, la inducció de gens necessaris pel pas de G1 a S i la progressió durant S. Alguns d'aquests gens són c-Myc, N-Myc, la dihidrofolat reductasa, la timidina sintetasa, l'ADN polimerasa α , la CDK2 i varies de les seues ciclines. El complex CDK2/ciclina E és el responsable principal del pas de G1 a S i seguirà fosforilant a Rb de manera que s'alliberin altres factors de transcripció que encara hi estan units. La fase S està marcada per l'inici de la replicació de l'ADN. Durant aquesta fase, el procés de replicació es produeix de manera simultània a múltiples llocs de la cromatina i s'ha de coordinar amb la transcripció dels gens necessaris pels passos següents del cicle i les funcions vitals de la cèl·lula. També es produeix una duplicació de les proteïnes nuclears que són necessàries per restaurar l'arquitectura cromatínica després de la replicació de l'ADN. El complex propi de la fase S és el format per CDK2/ciclina A, les fosforilacions del qual seran necessàries per la transcripció dels substrats requerits en la replicació de l'ADN i la inhibició d'alguns factors de transcripció de G1. La CDK1 i la ciclina A s'associen als voltants de la transició S/G2 i, una mica després, la CDK1 s'associa a la ciclina B provocant el pas de G2 a M. Aquest fet s'acompanya de la fosforilació de diversos substrats, entre ells les làmines nuclears i l'APC (*anaphase promoting factor*). La fosforilació d'APC és necessària per la degradació de la ciclina B requerida per a la transició a metafase i el final de la mitosi.

En cèl·lules normals, la progressió entre les diferents fases del cicle cel·lular es produeix després que la cèl·lula hagi passat pels anomenats *checkpoints* (veieu l'apartat 1.1). És a dir, en determinats punts del cicle, s'engeguen mecanismes cel·lulars per revisar si la cèl·lula ha efectuat l'anterior fase correctament o, si pel contrari, hi ha anomalies massa greus per ser reparades i la cèl·lula ha d'entrar en un procés d'apoptosi. Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per tenir aquests sistemes de revisió alterats o àdhuc inactivats i poden proliferar a pesar de que la integritat del seu genoma estigui compromesa. Aquest fenomen és denominat "inestabilitat genòmica".

En molts casos els processos tumorals estan associats a una desregulació de l'activitat de les CDKs a la cèl·lula tumoral (Malumbres i Carnero, 2003). Per aquesta raó, la restauració del control del cicle cel·lular pels inhibidors de CDKs ha estat una fita a assolir durant els darrers 10 anys de lluita contra el càncer (Senderowicz, 2003). Per exemple, s'ha observat que els inhibidors de CDK2 són capaços d'induir apoptosi selectivament en les cèl·lules tumorals (Gray et al, 1999; Meijer et al, 1997).

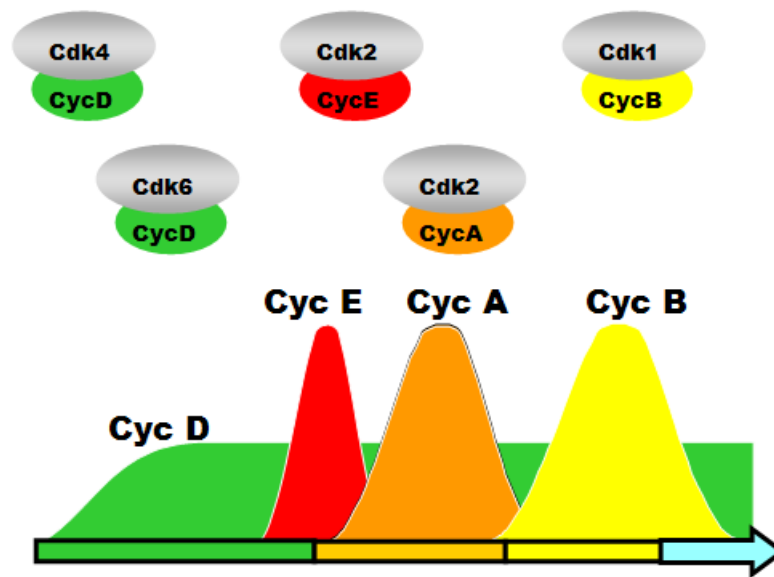


Figura 1.1. Esquema de les onades d'assemblatge de les CDKs i les ciclines durant el cicle cel·lular.

D'altra banda, algunes CDKs estan involucrades en funcions biològiques diferents de la del cicle cel·lular, com per exemple, la regulació de la transcripció, la diferenciació, la mort cel·lular o en el cas concret de la CDK5, en la regulació de les funcions neuronals.

1.1 ELS CHECKPOINTS

Els *checkpoints* són els mecanismes mitjançant els quals la cèl·lula, d'una manera activa, atura o alenteix la progressió del cicle cel·lular fins assegurar-se de que els processos previs, com per exemple la replicació de l'ADN o la mitosi, s'hagin completat. L'activació dels *checkpoints* condueix a la parada o alentiment del cicle, però alternativament també es produeixen respostes dirigides a reparar l'ADN o fins i tot a produir l'apoptosi. Malgrat que la definició clàssica de *checkpoint* no inclou aquestes respostes colaterals, la definició expandida que utilitzarem al llarg d'aquest text ho contemplarà. Els *checkpoints* són anomenats també "punts de control" o "punts de restricció". Existeixen diversos punts de control al llarg del cicle cel·lular que per exemple, es poden anomenar en funció de la fase del cicle on actuen. D'aquesta manera Kastan i Bartek (2004) proposen l'existència dels checkpoints de G1, de G1/S, de S i de G2/M. Aquests punts de control entren en funcionament quan es produeixen diversos tipus d'estrès, entre ells el dany a l'ADN o l'estrès oncogènic.

La diversitat d'estímuls inductors de dany cel·lular durant el cicle, ha originat l'aparició d'un gran nombre de proteïnes especialitzades per fer-los front. En general, s'estructuren com en qualsevol cascada

de transducció de senyal. Distingim unes proteïnes sensores, unes de transductores i unes d'efectores. Alternativament s'ha descrit l'existència d'una quarta categoria, les proteïnes moduladores. A continuació exposem un breu resum de com es produeix l'activació dels sistemes de checkpoint en resposta al dany de l'ADN segons una revisió de Massagué (2004). Existeixen uns complexos multiproteïcs que actuen com a sensors del dany, entre ells es troba una família de proteïna-cinases relacionades amb la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI3K). En aquesta família s'inclouen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) i ATR (*ATM and Rad3 related*). Cadascuna d'aquestes cinases semblen mostrar una especificitat major per un tipus de dany, per exemple, ATR s'activa per acció de la llum ultraviolada i la manca de replicació de l'ADN. ATM reconeix els trencaments de doble cadena causats per les radiacions ionitzants o altres factors. ATM i ATR activen les cinases transductores Chk1 i Chk2 respectivament. Chk1 inhibeix la fosfatasa Cdc25 induint la seua exclusió del nucli o la seua degradació. Aquest fet provoca l'acumulació de fosforilacions amb funció inhibidora a les CDKs, i per tant, el seu fre. La senyal a través de la via d'ATM-Chk2, activarà el factor de transcripció p53 que induirà l'expressió de p21Cip1/WAF1, de diversos factors pro-apoptòtics (Bax, Puma, Noxa, ...), de gens de reparació de l'ADN, dels de resposta al dany oxidatiu i de HDM2 (l'ortòleg humà de MDM2, *mouse double minute 2*). La decisió entre una resposta citostàtica a través de p21 o citocida (Bax, Puma, Noxa...), es fa per mecanismes que descriurem posteriorment. En alguns models s'ha descrit que l'activació dels gens pro-apoptòtics requereix la col·laboració d'altres membres de la família de p53 com p63 i p73 (Flores et al, 2004) però aquest fet no sembla extensible a tots els tipus cel·lulars (Senoo et al, 2004). La resposta pro-apoptòtica o citocida de p53 pot ser afavorida sobre la resposta citostàtica gràcies a co-factors de la família ASPP (*Apoptosis-stimulating proteins of p53*) que s'encarreguen de facilitar l'activació dels gens pro-apoptòtics sota el control transcripcional de p53 (Vousden i Lu, 2002).

P53 és una de les proteïnes efectores dels *checkpoints* (veieu la figura 1.2). És un factor transcripcional de vida mitja curta que per ser activat prèviament s'ha d'estabilitzar. L'activació de p53 desencadenarà diverses respostes antiproliferatives com la parada del cicle, la diferenciació, la senescència cel·lular o l'apoptosi. Un dels mecanismes d'estabilització de p53 és la fosforilació. Aquesta proteïna pot ser fosforilada per alguns dels components dels *checkpoints* com ATM, ATR, ADN-PK, Chk1 i Chk2. Curiosament el fet que Chk2 i que ATM siguin dos elements de la mateixa via i que els dos siguin capaços de fosforilar p53 a la Ser¹⁵ (Vousden et al, 2002) evidencia que no existeix una perfecta delimitació entre els diversos components de la via de transducció dels *checkpoints*. Altres modificacions de p53 com l'acetilació augmenten la seua activitat transcripcional mentre que l'acció de desacetilases com Sir2 redueixen la seua activitat i afavoreixen la supervivència en situacions d'estrès cel·lular (Brooks i Gu, 2003).

La inhibició de la CDK2 indueix l'activació del *checkpoint* de fase S. La interrupció de l'activitat CDK2

s'ha realitzat per diferents aproximacions: la farmacològica gràcies a la olomoucina, la roscovitina i el compost 25, i la molecular, gràcies al RNAi i a formes dominants negatives de la CDK2. La inhibició de l'activitat CDK2 en diverses línies cel·lulars provoca una resposta p53-p21 (Zhu et al, 2004). Aquesta resposta és dependent de la fosforilació de la Ser¹⁵ per p53 a través de la via ATM. Zhu et al. no descarten que la inhibició de CDK2 pugui induir un dany real a l'ADN ja que en la literatura s'ha descrit que l'olomoucina i la roscovitina provoquen la fragmentació nucleolar (David-Pfeuty, 1999) (veieu l'apartat 2.2).

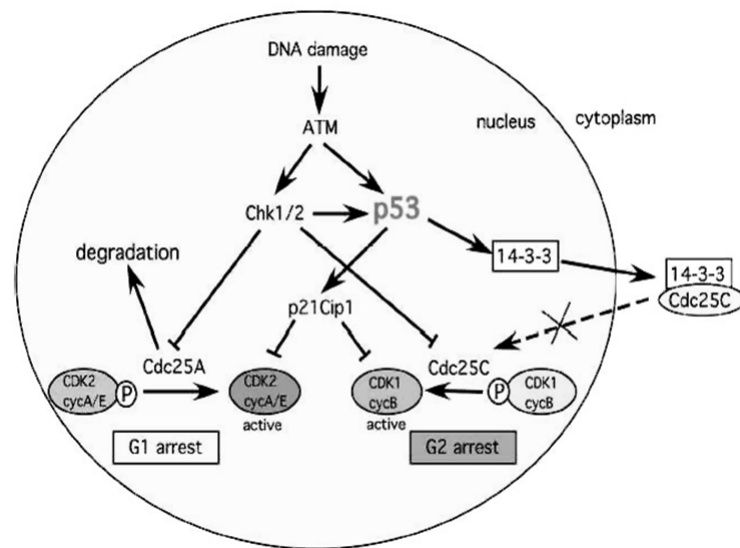


Figura 1.2. Activació de p53 a través dels checkpoints.

1.2 LES CDKs

Les CDKs són cinases de serina (Ser) o treonina (Thr). La primera CDK en ser identificada va ser Cdc2 a llevats. Posteriorment s'han identificat altres membres de la família tant en el regne animal com en el vegetal gràcies a la homologia que guarden entre si. Quant a les ciclins, la parella fisiològica de les CDKs, van ser identificades per primer cop en embrions d'orquídies. Posteriorment, gràcies a la gran conservació d'aquestes proteïnes al llarg dels fílums, s'han anat identificant en altres espècies. Actualment es coneix l'existència en el genoma humà dels gens d'aproximadament 13 CDKs i 30 proteïnes amb un domini homòleg al *cyclin box* que caracteritza a les ciclins, de les quals s'ha identificat l'expressió de 10 CDKs i 11 ciclins. Malgrat que inicialment les CDKs s'estudiaven pel seu paper en el cicle cel·lular, gradualment ha quedat clar que alguns membres de la família tenen papers en contextos diferents.

Les CDKs es sintetitzen en un estat basal d'inactivitat i es caracteritzen per requerir l'associació d'una altra proteïna per assolir l'activitat màxima. En general tenen aproximadament 300 aa de grandària

i un pes molecular de 33 a 60 KDa, comparteixen amb les altres proteïna-cinases el fet de contenir 11 subdominis característics a la seua seqüència. La seua activació depèn de la unió amb una subunitat catalítica que s'anomena ciclina. Moltes CDKs han estat identificades mitjançant la comparació amb la seqüència d'altres CDKs ja conegudes, aquest fet ha revelat la presència del motiu conservat "PSTAIRE" localitzat al domini d'unió de la ciclina a la CDK. Les CDKs són una família de proteïnes amb una elevada homologia (40 a 75% de similitud de CDK1 a CDK7) que contenen una zona catalítica conservada i una estructura terciària comú evidenciada en estudis cristal·logràfics. La seqüenciació del genoma de *Caenorhabditis elegans* ha mostrat que aquest codifica 14 CDKs i 34 ciclines. En el cas de l'ésser humà el darrer còmput de CDKs es redueix a 10 (CDK1 a 9 més la CDK11) i el de ciclines a 11. Curiosament, es desconeix la cinasa que s'associa a les ciclines F, G i I i a més, desconeixem la ciclina que s'associa a algunes de les anomenades "cinases relacionades amb les CDKs". Per aquesta raó, aquestes cinases són anomenades per la seqüència del seu motiu "PSTAIRE", més concretament, per les variacions d'aquest. Per exemple, és el cas de les següents "cinases relacionades amb les CDKs": PCTAIRE 1-3, PFTAIRE, etc.

L'activació màxima del dímer CDK/ciclina requereix de certes fosforilacions i desfosforilacions. En el cas de la CDK2 es fosforila el residu corresponent a la Thr¹⁶⁰ situat en una estructura anomenada llaç T. Aquesta fosforilació es realitzada per la CAK (veieu l'apartat 1.2.3), un complex que es forma en associar-se la CDK7/ciclina H i MAT1 (*Ménage-à-trois 1*). La CDK també ha d'experimentar la desfosforilació de la Thr¹⁴ i Tyr¹⁵, dos residus inhibidors de l'activitat, localitzats bordejant el domini d'unió de l'ATP.

En els següents subapartats presentarem la CDK1, la CDK2, les CDKs amb activitat transcripcional i la CDK5.

1.2.1 La CDK1

La CDK1 de mamífers va ser identificada per primer cop per homologia amb la Cdc2 dels llevats de fissió. Aquests llevats es caracteritzen per tenir una sola CDK que, a través de la unió a diverses ciclines, fa que el cicle avanci. De forma diferent que en llevats, com ja hem esmentat, el cicle de mamífers està acoblat a l'activació seqüencial de diverses CDKs. El ratolí *knock-out* per la CDK1 mor en etapes primerenques del desenvolupament embrionari (Martin et al., 2005). La CDK1 o Cdc2, forma un complex amb la ciclina B anomenat MPF (*Mitosis Promoting Factor*). Aquest es caracteritza pel seu paper essencial durant la mitosi. Els nivells d'activació del MPF es mantenen alts en el pas de la profase a la metafase per, immediatament, davallar sota l'acció d'APC (*Anaphase Promoting Complex*). La regulació espai-temporal de l'activitat del MPF és essencial per la progressió normal del cicle cel·lular. A continuació, s'exposen breument alguns mecanismes fisiològics de regulació de l'activitat del MPF, però que són extensibles a

altres complexes CDK/ciclina :

- Canvis en els nivells d'alguns dels seus components. Per exemple, a nivell de la transcripció de la ciclina o de la CDK (aquesta darrera és de menor importància).
- Modificacions post-traduccionals dels seus components. Per exemple, es coneix que un seguit de fosforilacions i desfosforilacions sobre la cinasa regulen l'activitat del complex.
- Interacció amb els inhibidors fisiològics de les CDKs.
- Localització subcel·lular dels membres del complex. Per exemple, només la forma fosforilada de la ciclina B es localitza al nucli.
- Estabilitat de les proteïnes que conformen el complex. Aquest punt de control és especialment important en el cas de les ciclins, els nivells de les quals oscil·len al llarg del cicle, en part, a través d'un sensible control de la degradació de la proteïna.

Durant la mitosi, l'activitat del MPF és requerida per finalitzar els darrers passos del traspàs del material genètic. Precisament, els mecanismes de *checkpoint* estan dissenyats per aprofitar la plasticitat del sistema i, en cas necessari, frenar la divisió cel·lular. Els efectes de l'activació dels *checkpoints* d'estructura de l'ADN (activats, per exemple, quan es produeix una replicació incompleta de l'ADN o bé quan hi ha trencaments de la cadena d'ADN) sobre l'activitat del MPF són:

- Activació de Myt1 i Wee que fosforilaran la Thr¹⁴ i la Tyr¹⁵. Aquestes fosforilacions inhibeixen l'activitat del MPF.
- Activació de les cinases Chk1 i Chk2 pertanyents als mecanismes de *checkpoint*. Aquestes cinases actuen frenant l'activació del MPF.

Els efectes de l'activació del *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic sobre l'activitat del MPF estan mediat principalment per APC i són:

- Inhibició, per exemple, de la via APC de degradació de la ciclina B1 i de la securina.

L'entrada en mitosi sense una replicació total de l'ADN pot provocar la catàstrofe mitòtica (veieu l'apartat 5). És a dir, en les situacions on es produeix una entrada prematura del complex CDK1/ciclina B actiu al nucli, es desencadena una condensació precoç de la cromatina acompanyada d'apoptosi. L'augment dels nivells de ciclina B1 és un fet àmpliament descrit en diversos paradigmes experimentals on

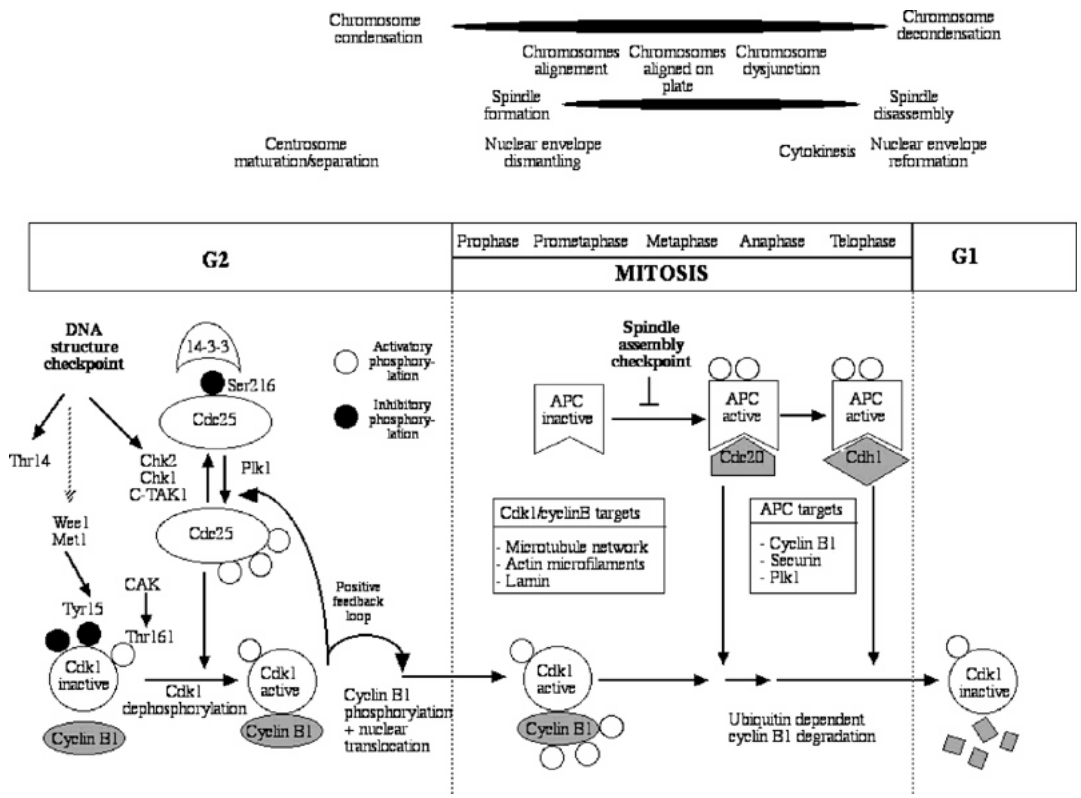


Figura 1.3. Esquema de la regulació del MPF durant la mitosi (Castedo et al., 2004). El complex CDK1/ciclina B s'activa durant el pas de G2 a M a través de diferents passos. Primerament, es realitza la fosforilació activadora de CDK1 per CAK (a la Thr¹⁶¹) i la desfosforilació inhibidora realitzada per la fosfatasa Cdc25C (a les Thr¹⁴ i la Tyr¹⁵). Alternativament, es produeix l'associació de la CDK1 i de la ciclina B produint-se el transport del complex actiu al nucli. Al nucli, múltiples substrats mitòtics seran fosforilats. Posteriorment, durant l'anafase, s'activa APC i envia la ciclina B a la via proteasomal. Com a resultat, el MPF passarà a ser inactiu. Aquest pas és una condició prèvia a l'entrada en anafase. El *checkpoint* d'estructura de l'ADN activa diverses cinases com la Chk1 i la Chk2 que fosforilen la Cdc25C a la Ser²¹⁶ i causen la seua inactivació. L'activació del *checkpoint* del fus mitòtic retarda la maduració de l'APC de manera que es retarda la degradació de la ciclina B.(Castedo M. et al., 2004).

es produeix el fenomen de catàstrofe mitòtica, com passa en cèl·lules tumorals en resposta a tractaments farmacològics (fluorouracil, doxorubicina,...) o bé en models cel·lulars sotmesos a determinats procediments (inducció d'heterocarions per fusió cel·lular). En aquest darrer cas, la inhibició de CDK1 mitjançant l'expressió de dominants negatius o amb inhibidors farmacològics de CDKs, com l'olomoucina i la roscovitina, prevenen l'apoptosi d'aquests heterocarions (Castedo et al., 2001).

D'altra banda, l'augment de l'activitat de CDK1 ha estat observada en nombrosos models de mort apoptòtica. La inhibició d'aquesta activitat mitjançant diverses aproximacions (inclosos els inhibidors químics de CDKs) ha suggerit que precisament aquesta activació és un pas previ a l'inici de la cascada apoptòtica. Per exemple, les cèl·lules leucèmiques monomielocítiques HL-60 activen CDK1 en resposta al taxol i l'activació no es veu afectada ni per Bcl-2 ni per Z-VAD-fmk, encara que la sobreexpressió de Bcl-2 sí inhibeix la sortida de Cyt c del mitocondri (Ibrado et al., 1998). És més, la CDK1 ha estat implicada directament en l'inici de la via intrínseca d'apoptosi. En aquest cas s'ha vist com, per exemple, la CDK1 és capaç d'induir la permeabilització del mitocondri a través de la fosforilació de Bad a la Ser¹²⁸. Aquest fet provoca la pèrdua d'interacció entre el membre pro-apoptòtic de la família de Bcl-2 i la proteïna 14-3-3. La pèrdua d'aquesta interacció permet la inserció de Bad al mitocondri (Konischi et al., 2002). D'altra banda, una activació sostinguda de l'activitat de CDK1 pot activar indirectament p53. Aquesta proteïna actuaria augmentant la transcripció de les proteïnes pro-apoptòtiques de la família de Bcl-2, Bax i Puma, les quals activarien la via intrínseca d'apoptosi (Castedo et al., 2001). Malgrat les anteriors observacions, es desconeix en detall els mecanismes pels quals la CDK1 facilita la inducció d'apoptosi. Fins i tot és possible que la CDK1 actuï afavorint indirectament l'apoptosi a través de la inducció de l'entrada en mitosi i que, des d'aquí, prepari el camí per la catàstrofe mitòtica (Castedo et al., 2004).

1.2.2 La CDK2

La CDK2 forma complexos actius amb la ciclina E, A1 i A2 (l'expressió de la ciclina A1 està restringida a les cèl·lules germinals). La màxima activitat CDK2/ciclina E es detecta durant el trànsit de G1 a S (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992), mentre que els nivells d'activitat de l'altre complex format per la CDK2, el CDK2/ciclina A, són baixos a finals de la fase G1 i van augmentant progressivament a mesura que es produeix la replicació de l'ADN. Finalment, l'activitat d'aquest complex desapareix quan la ciclina A és degradada al principi de la mitosi. Els MEFs provinents del doble *knock-out* murí de les ciclines E (E1 i E2), poden proliferar amb normalitat però, en canvi, són incapaços d'entrar en cicle després d'una sincronització en G0 per privació sèrica (Geng et al., 2003). El ratolí doble *knock-out* per les ciclines E mor a meitat de la gestació degut a anomalies del trofoblast però sense que l'embrió presenti defectes de

proliferació (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). Alternativament, s'ha demostrat que la disrupció de la ciclina A2 desencadena letalitat precoç durant el desenvolupament murí (Murphy et al, 1997). Durant la fase G1, el complex CDK2/ciclina E fosforila p27 per permetre'n la degradació (Elledge i Harper, 1998) i a més, segueix fosforilant Rb en llocs diferents als fosforilats per les CDKs associades a les ciclins D (Harbour i Dean, 2000). Addicionalment, la CDK2/ciclina E fosforila un segon tàndem de proteïnes que estan més directament implicades en la duplicació cel·lular; aquestes fosforilacions regulen la replicació de l'ADN, l'expressió dels gens de les histones i la duplicació dels centrosomes (Yu i Sicinski, 2004). Finalment, la CDK2 coordina la sortida de la fase S a través de l'activació de la CDK1 (Mitra i Enders, 2004).

A nivell estructural, la CDK2 conté un lòbul amino-terminal (residus 1 a 85) ric en plegaments β i un lòbul carboxi-terminal gros i pràcticament constituït per hèlixs α . Al lòbul amino-terminal trobem també una zona α -helicoidal que conté la seqüència PSTAIRE d'unió a les ciclins. El domini d'unió a l'ATP es situa en un solc profund entre els dos lòbuls i conté residus catalítics conservats entre les proteïna-cinases dels eucariotes. En aquesta mateixa zona també s'uneix el substrat i es produeix la transferència del grup fosfat. Els estudis cristal·logràfics realitzats amb la CDK2 o CDK2/ciclina A, han revelat que la unió de la ciclina és de gran importància per l'estructura de la cinasa. Morris et al. (2002) demostren que la formació del complex CDK2/ciclina A és un procés de dos passos durant els quals, després de la unió de la ciclina, el plegament induït per aquesta, forçarà la cinasa a una estructura activa. En primer lloc, la unió de ciclina promou una reconfiguració del centre catalític de la cinasa a través del canvi conformacional del motiu "PSTAIRE" i el reposicionament dels lòbuls N- i C-terminal de la cinasa. En segon lloc es produiran una sèrie de contactes addicionals entre el lòbul C-terminal de la CDK i el N-terminal de la ciclina que induiran l'activació completa de la CDK. Aquest darrer pas implica, d'una banda, el desplaçament del llaç T fora del lloc catalític de la CDK per permetre la fosforilació activadora sobre la Thr¹⁶⁰ i, de l'altra, s'estructurarà el lloc d'unió del substrat. L'elevada homologia dels dominis catalítics de les diferents CDKs fa preveure que, en general, les estructures tridimensionals d'altres CDKs siguin similars a la de la CDK2 així com els seus mecanismes d'activació.

La CDK2 és una cinasa molt conservada filogenèticament. Molts autors li havien atribuït un paper essencial en l'inici, la progressió i la sortida de la fase S. Sorprenentment, publicacions recents han demostrat que en certes línies cel·lulars de càncer de còlon, l'activitat CDK2 no és requerida per la proliferació en cultiu (Tetsu and McCormick, 2003). És més, els ratolins *knock-out* per la CDK2, són viables encara que estèrils degut a defectes meiótics (Berthet et al, 2003; Ortega et al, 2003). S'ha observat que els MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) CDK2 -/- en cultiu, proliferen normalment però que experimenten una disminució de la capacitat de sortida de l'estat de quiescència i/o en la proporció de cèl·lules en

fase S, característica que es veu agreujada a mesura que el cultiu envulleix. Un dels primers candidats plantejats per suplir la CDK2, va ser la CDK1, especialment perquè podia ser activada tant per la ciclina A com per la ciclina B, sintetitzades a finals de la fase G1 i durant la fase S, respectivament (Pines i Hunter, 1990). A més, els ratolins knock-out de CDK1 morien precoçment durant el desenvolupament embrionari, fet que suggeria que la CDK1 era important per la proliferació cel·lular i que la seua inactivació era incompatible amb la vida. Un argument en contra de la CDK1 com suplent de CDK2, era que els MEFs immortalitzats procedents de ratolins CDK2 *-/-* presentaven una menor activitat cinasa associada a la ciclina A (Berthet et al., 2003). En aquest sentit, publicacions com la de Moore et al. (2003) ficaven en dubte que la CDK1 unida a la ciclina B fos l'única CDK essencial en les cèl·lules proliferants de mamífers. Al·legaven que, malgrat que aquest complex pogués estar regulant la proliferació cel·lular a través d'una activitat mínima, faltaria comprendre com evitava el control realitzat pel patró temporal d'expressió i la compartimentalització de la ciclina B. Ambdós aspectes impedirien explicar com la CDK1/ciclina B podrien formar un complex nuclear actiu durant la transició de G1 a S. Recentment, Aleem et al. (2005) han evidenciat que els complexos CDK1/ciclina E regulen la transició de G1 a S (veieu la figura 1.4). Aquests resultats suggereixen que la CDK1 és la CDK essencial funcionalment a les cèl·lules de mamífer i que és capaç de reemplaçar CDK2 en la proliferació de les cèl·lules de mamífer. A pesar de la contundència d'aquests treballs, a continuació detallarem altres hipòtesis que han intentat explicar la manca de letalitat del *knock-out* de CDK2. En primer lloc, es va plantejar que fossin altres CDKs (amb les seues ciclines corresponents) les que suplissin la CDK2. Per exemple, es va formular la hipòtesi que una cinasa desconeguda, associada a la ciclina F, podria ser la cinasa vicariant de la CDK2. Els MEFs deficitaris per la ciclina F cicle més lentament que els salvatges i presenten una certa dificultat per passar de la quiescència a G1 (Tezloff et al., 2004). Una altra possibilitat contemplada és que les CDKs implicades en transcripció, és a dir la CDK7, 8 i 9, pogués suplir la CDK2. És més, Murray (2004) suggeria que altres cinases implicades en la replicació de l'ADN (Cdc7/Dbf4, un duet format per la cinasa i el seu activador) o en la mitosi (les cinases Polo, les Aurora, etc) entre moltes d'altres, podien tenir un paper substitutori en absència de CDK2 (Sherr i Roberts, 2004).

1.2.3 Les CDKs amb activitat transcripcional

Diversos complexos CDK/ciclina intervenen en la transcripció de l'ARN. A continuació introduïm aquests complexos. El complex format per CDK7/ciclina H/MAT1 (*ménage à trois 1*) rep el nom de CAK (*cyclin-dependent kinase activating kinase*). CAK és la responsable de la fosforilació activadora de les CDK1, 2, 4 i 6. Per exemple, en el cas de la CDK2, que és la més coneguda a nivell estructural, CAK realitza la fosforilació de la Thr¹⁶⁰. Perquè CAK fosforili eficientment és necessari que la cinasa substrat

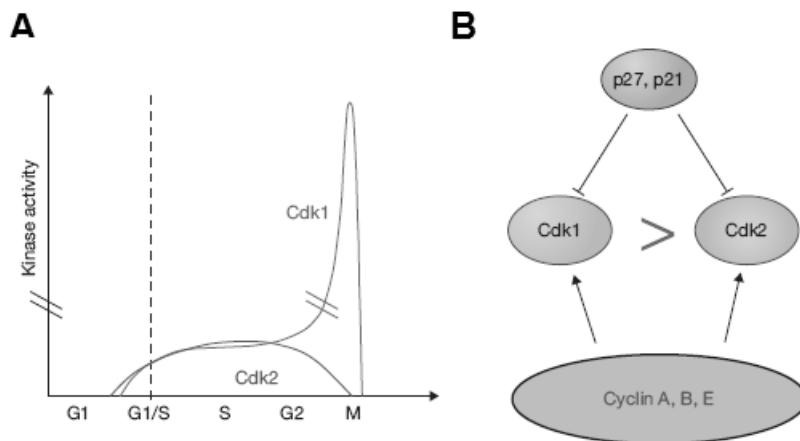


Figura 1.4. Regulació de l'activitat CDK1 i CDK2 (Bashir i Pagano, 2005). (A) Perfil relatiu de l'activitat CDK1 i CDK2 durant el cicle cel·lular. L'activitat de la CDK1 durant la transició de G1 a S podria haver escapat a la detecció per qüestions de proporció ja que és molt inferior al pic detectat durant la fase G2/M. A pesar d'això, en absència de CDK2, baixos nivells d'activitat CDK1 s'han mostrat suficients per induir l'entrada en fase S i iniciar la replicació de l'ADN. Es pensa que en presència de CDK2, la CDK1 continua tenint un paper essencial a G1/S i que la CDK2 només té funcions moduladores. Alternativament, no es descarta que altres CDKs a part de les anteriorment citades, actuïn sinèrgicament en la transició de G1 a S. (B) Tant la CDK1 com la CDK2 són activades per les ciclins A, B i E. A més, ambdues cinases formen complexos inhibits per p27 i p21. Tanmateix, la CDK1 és essencial per la viabilitat mentre que la CDK2 no.

estigui ja unida a la ciclina. Els CKIs (*cyclin-dependent Kinase inhibitors*) eviten aquesta fosforilació sense unir-se directament a la CAK, simplement a través de fer que la cinasa de cicle canviï de conformació i no pugui ser fosforilada (Aprelikova et al., 1995). Alternativament, la CAK juntament amb unes altres sis subunitats formen el complex TFIIH, responsable de la fosforilació de CTD (domini carboxi-terminal) de la subunitat gran de la ARN polimerasa II (CTD ARN pol II). L'extrem carboxi-terminal de la ARN polimerasa II conté un gran nombre de seqüències de fosforilació, per exemple, en mamífers són 52. La deleció total o parcial del CTD en diverses espècies, entre elles el ratolí, danya seriosament la transcripció i promou la letalitat embrionària. Aquestes evidències demostren el paper clau del CTD en la regulació del creixement durant el desenvolupament (Loyer et al., 2005). La fosforilació del CTD per TFIIH intervé en la progressió de la transcripció des de l'estadi de preiniciació al d'iniciació (veieu l'apartat 1.5). L'activitat de la CDK7 és més elevada en les cèl·lules ciclants que en les mateixes cèl·lules sincronitzades en G₀ a través de la privació tròfica (Poon et al., 1994). Els nivells de CDK7, en les cèl·lules tumorals, és moderadament més elevat que en les seues homòlogues normals (Bartkova et al., 1996). Els experiments realitzats amb formes termosensibles de CDK7 en blastòmers embrionaris de *Caenorhabditis elegans* mostren que la parada del cicle és deguda al bloqueig de l'activitat CAK de la CDK7 més que no pas al de l'activitat fosforiladora de CTD ARN pol II (Wallenfang i Seydoux, 2002). Resultats similars han estat obtinguts en el model de *Drosophila melanogaster*, on els mutants de CDK7 es morien durant o abans de l'estadi de formació de la pupa per defectes greus durant la mitosi (Larochelle et al., 1998).

El fenotip era semblant al del mutant per pèrdua de funció de CDK1, fet que és considerat un indicatiu de que es tracta d'un gen necessari per la proliferació mitòtica. En mamífers s'ha realitzat una aproximació genètica diferent de les anteriors ja que no s'ha realitzat la mutació directa del gen de CDK7, sinó de MAT1 (un dels components de CAK). Els ratolins *knock-out* per MAT1 mostren una afectació greu de la mitosi que els condueix a la mort en etapes embrionàries primerenques (Rossi et al, 2001). En aquest model no es va observar una disminució de la transcripció, confirmant els anteriors resultats amb altres organismes on la inhibició de l'activitat CTD no era responsable de la mort. Al mateix temps, s'ha vist que les cèl·lules madures post-mitòtiques són viables durant alguns mesos sense MAT1. En un model de cèl·lules musculars llises de l'aorta de rata, el bloqueig de l'expressió de MAT1 per ARN antisentit, induïx la parada en G1 i l'apoptosi (Wu et al., 1999). Aquest mateix bloqueig en G1 s'ha observat en dos línies cel·lulars derivades d'osteosarcoma després d'eliminar MAT1 (Wu et al., 2001). En aquests casos, la parada de cicle s'ha pogut correlacionar amb una disminució de la fosforilació de Rb. Alternativament, s'ha plantejat la inhibició farmacològica com una estratègia alternativa per estudiar les funcions biològiques de la CDK7. En aquest sentit, tant el flavopiridol com la R-roscovitina són compostos amb activitat antiproliferativa "in vivo" però amb un massa ampli espectre de cinases inhibides (entre les quals es troba la CDK7), la qual cosa dificulta qualsevol interpretació. El paper de CDK7 en la transcripció i la qüestió de si la inhibició d'aquesta cinasa provoca toxicitat, són dos punts controvertits. S'ha demostrat que la CDK7 no és necessària per a la transcripció "in vitro" mitjançant l'ús de CDK7 *kinase-dead*¹ (Makela et al., 1995) i l'inhibidor farmacològic H8 (Serizawa et al, 1993). Els resultats de disminució de la transcripció "in vivo" són contradictoris en funció del model utilitzat. S'ha suggerit que l'activitat CDK9/ciclina T podria estar substituint la de CDK7 quan aquesta cinasa és absent. El bloqueig de l'expressió de MAT1 en ratolins no provoca una disminució de la transcripció (Rossi et al., 2001). Per tant, els resultats en aquest model són congruents amb els obtinguts en cèl·lules postmitòtiques, les quals no veuen afectada la seua viabilitat en aquestes condicions (Lolli i Johnson, 2005). Una altre complex CDK/ciclina, amb activitat transcripcional, és el format per l'associació de CDK8 i ciclina C. Aquest dímer ha estat aïllat en complexos multiproteics juntament amb l'ARN pol II. Intervé en la fosforilació de l'extrem CTD de l'ARN pol II en llocs diferents als de la CDK7, suggerint un mecanisme de regulació transcripcional diferent. S'ha vist que l'activitat d'aquest complex regula tant l'activació com la repressió de la transcripció. Finalment, CDK9/ciclina T és un component del factor positiu d'elongació P-TEFb. És responsable de l'activitat cinasa associada a Tat durant la infecció per HIV-1. S'ha descrit que fosforila l'extrem carboxi-terminal de l'ARN polimerasa II i promou l'elongació de l'ARNm.

¹Les cinases *kinase-dead* són aquelles a les que s'ha inactivat el domini catalític, és a dir, són incapaces de fosforilar els seus substrats.

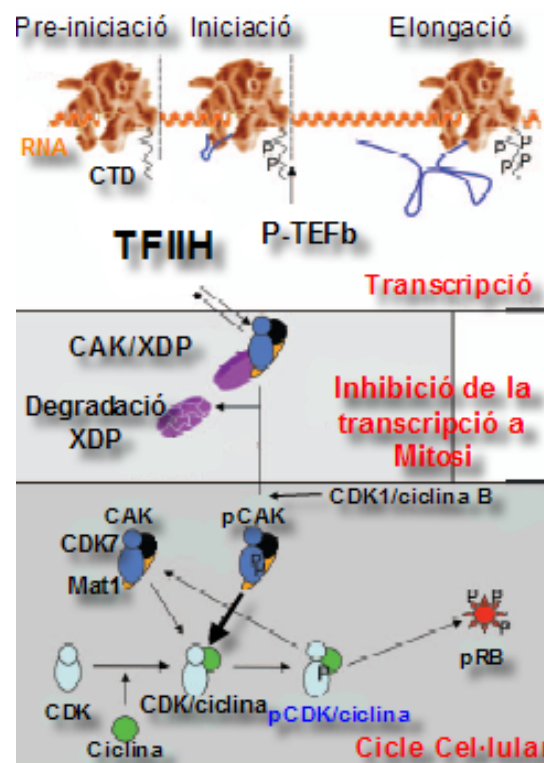


Figura 1.5. Mecanismes de regulació de la CDK7 durant la transcripció i el cicle cel·lular segons Loli i Johnson (2005). La CDK7 juntament a 6 subunitats més, constitueix el complex TFIIF. Aquest regula la progressió de la transcripció des de l'estadi de pre-iniciació al d'iniciació a través de la seua activitat fosforiladora del domini carboxi-terminal (CTD) de l'ARN pol II. Durant la mitosi, a través de la degradació de la subunitat XPD (*xeroderma pigmentosum disorder group D*) de TFIIF i de la fosforilació per CDK1/ciclina B, la CDK7 es dissocia de TFIIF de forma que la transcripció queda inhibida. La CAK lliure regula el cicle a través de la fosforilació del complex CDK/ciclina. Alternativament la CDK1 fosforila la CDK7 i inhibeix l'activitat cinasa sobre el CTD.

1.2.4 La CDK5

La detecció d'activitat CDK en neurones, és a dir, en cèl·lules terminalment diferenciades, va portar a la identificació de la CDK5 i del seu paper funcional en el sistema nerviós. En condicions normals l'activitat CDK5 és necessària pel creixement de les neurites, la migració neuronal i la configuració laminar del còrtex cerebral (Lew et al., 1994; Tsai et al., 1994; Humbert et al., 2000). Presenta, a més a més, un paper a la miogènesi i l'organització dels somites en l'embrió de *Xenopus laevis* i a la remodelació dels teixits (Meijer, 2000). CDK5 podria tenir un paper a l'inducció d'apoptosi ja que la seua activitat correlaciona amb el número de cèl·lules apoptòtiques en teixits en desenvolupament i en aquells que estan en procés de remodelació.

Una CDK amb funcions tan diferents ha de tenir, per força, una regulació molt acurada a nivell d'associació a la seua subunitat reguladora. CDK5 s'uneix a dues subunitats reguladores de naturalesa comú que no pertanyen a la família de les ciclines, p35 i p39 (Lew et al., 1994; Tsai et al., 1994). Alternativament, també existeixen la forma p25 i la p29, provinents del tall de les anteriors proteïnes de 35 KDa (p35) i 39 KDa (p39) respectivament. Cal destacar que tot i la distància evolutiva que les separa de les ciclines, actuen de forma similar. Això és perquè a nivell de plegament espacial, p35 presenta similituds amb les ciclines clàssiques. La forma p25 es caracteritza per provocar una activació constitutiva de la CDK5 i, al mateix temps, per induir una alteració de la seua localització subcel·lular i de l'especificitat pels substrats (Patrick et al., 1999). En els cervells dels pacients amb la malaltia d'Alzheimer, la CDK5/p25 i la GSK-3 són les responsables principals de l'augment de la fosforilació de la proteïna tau, que desencadenarà l'aparició dels agregats característics de la malaltia. D'altra banda, s'ha vist que l'expressió del dímer CDK5/p25 en cultius primaris neuronals, induïx apoptosi (Patrick et al., 1999). Aquestes observacions indiquen que l'activació de la CDK5 estaria involucrada en els desordres del citoesquelet i la mort neuronal observada en la malaltia d'Alzheimer (Meijer, 2000).

Els ratolins CDK5 $-/-$ i també els p35 $-/-$ tenen defectes neurals que presumiblement s'originen per una apoptosi inapropiada durant el desenvolupament del còrtex i d'altres regions del cervell. En el cas dels CDK5 $-/-$ la mort es produeix de forma perinatal (Ohshima et al., 1996) mentre que els p35 $-/-$ presenten un fenotip menys greu i els individus són viables i fèrtils (Chae et al., 1997; Ohshima et al., 2001). CDK5 pot frenar la mort a nivell neuronal en resposta a l'activació de les JNKs (*jun N-terminal kinases*). Les JNKs són molècules senyalitzadores pro-apoptòtiques, la JNK3 fosforila i activa la transcripció de c-Jun, que al seu torn està implicat en la transcripció d'altres gens de la via de mort cel·lular. La JNK3 s'expressa selectivament al cervell, com la CDK5 i la p35. El complex CDK5/p35 fosforila la JNK3 "in vivo" i "in vitro". Aquesta fosforilació disminueix la capacitat de JNK3 de fosforilar c-Jun i interromp la transcripció de gens pro-apoptòtics dependent de c-Jun (Li et al., 2002). Alternativament, s'ha observat

III – INTRODUCCIÓ

la implicació del complex CDK5/p35 en el tràfic de proteïnes al Golgi durant el creixement neuronal. És més, la inhibició de l'activitat cinasa en cultius primaris de neurones embrionàries amb aproximacions antisentit o a través de fàrmacs, concretament amb l'olomoucina, bloqueja la formació de les vesícules des de l'aparell de Golgi (Paglini et al., 2001). Finalment, esmentem que la CDK5 ha estat implicada en la via de senyalització de la dopamina, la qual cosa la involucra en fenòmens d'addicció psíquica (Bibb et al., 1999).

En conclusió, la CDK5 té un paper rellevant en el funcionament del sistema nerviós i, com hem esmentat anteriorment, l'activació adequada de CDK5 és necessària per la supervivència neuronal. Una activació de la CDK5 inapropiada (per exemple, a través de l'unió a les formes p25 o p29) és inductora de mort.

INHIBIDORS FARMACOLÒGICS DE CDKs.

A la dècada del 1950, el descobriment per E. Krebs i E. Fischer de la fosforilació de proteïnes com element regulatori de molts esdeveniments cel·lulars juntament a l'aparició de les proteïna-cinases, va suposar un més ampli coneixement dels diferents paràmetres cel·lulars que determinen el destí de la cèl·lula. És més, és ben conegut que la regulació anòmala de les cascades de fosforilacions és un succés freqüentment associat a certes patologies humanes, i alternativament s'ha observat que la regulació descontrolada de les cinases o de les fosfatases podria contribuir directament a l'aparició d'algunes patologies (Meijer i Raymond, 2003). La seqüenciació íntegra de genomes de diferents organismes ha aportat noves dades sobre els gens que codifiquen les cinases a diferents espècies. Els resultats dels treballs de Manning et al. (2002) s'articulen en forma d'un dendograma de les cinases del genoma humà (veieu la figura 2.4). A partir d'aquesta publicació, s'empra el terme *kinome* per parlar de la totalitat de cinases contingudes en un genoma. L'estudi d'aquestes cinases i les seues funcions, obre nous horitzons terapèutics. Aquest és el cas de les CDKs, unes proteïna-cinases desregulades en processos tumorals.

Les estratègies per inhibir l'activitat de les CDKs poden seguir dues aproximacions principals, la primera d'elles és la inhibició o activació d'un regulador del complex (ciclina, CKI, cinases o fosfatases). La segona, la interrupció de l'activitat catalítica de l'enzim. Aquesta segona aproximació ha estat la més utilitzada, de manera que s'han dissenyat compostos de mida petita, dirigits a competir pel lloc d'unió de l'ATP a la CDK. Aquest apartat serà tractat amb detall a les pàgines següents. Alternativament, s'ha optat pel disseny de petits pèptids amb homologia als residus de la ciclina que intervenen en el reconeixement del substrat. Els resultats publicats amb aquests pèptids, mostren que alguns d'ells són eficients per induir la parada del cicle o l'apoptosi en cèl·lules tumorals "in vitro" (Ball et al., 1997; Chen et al., 1999) i "in vivo" (Mendoza et al., 2003). En base a l'anterior, proposem la següent classificació operativa:

Fàrmacs inhibidors de CDKs no antagonistes de l'ATP. Són escasses les publicacions en la bibliografia que tracten sobre fàrmacs inhibidors de CDKs amb mecanismes d'acció alternatius a la competició pel lloc d'unió de l'ATP a la cinasa. Mendoza i els seus col·legues (2003) presenten una sèrie de pèptids amb

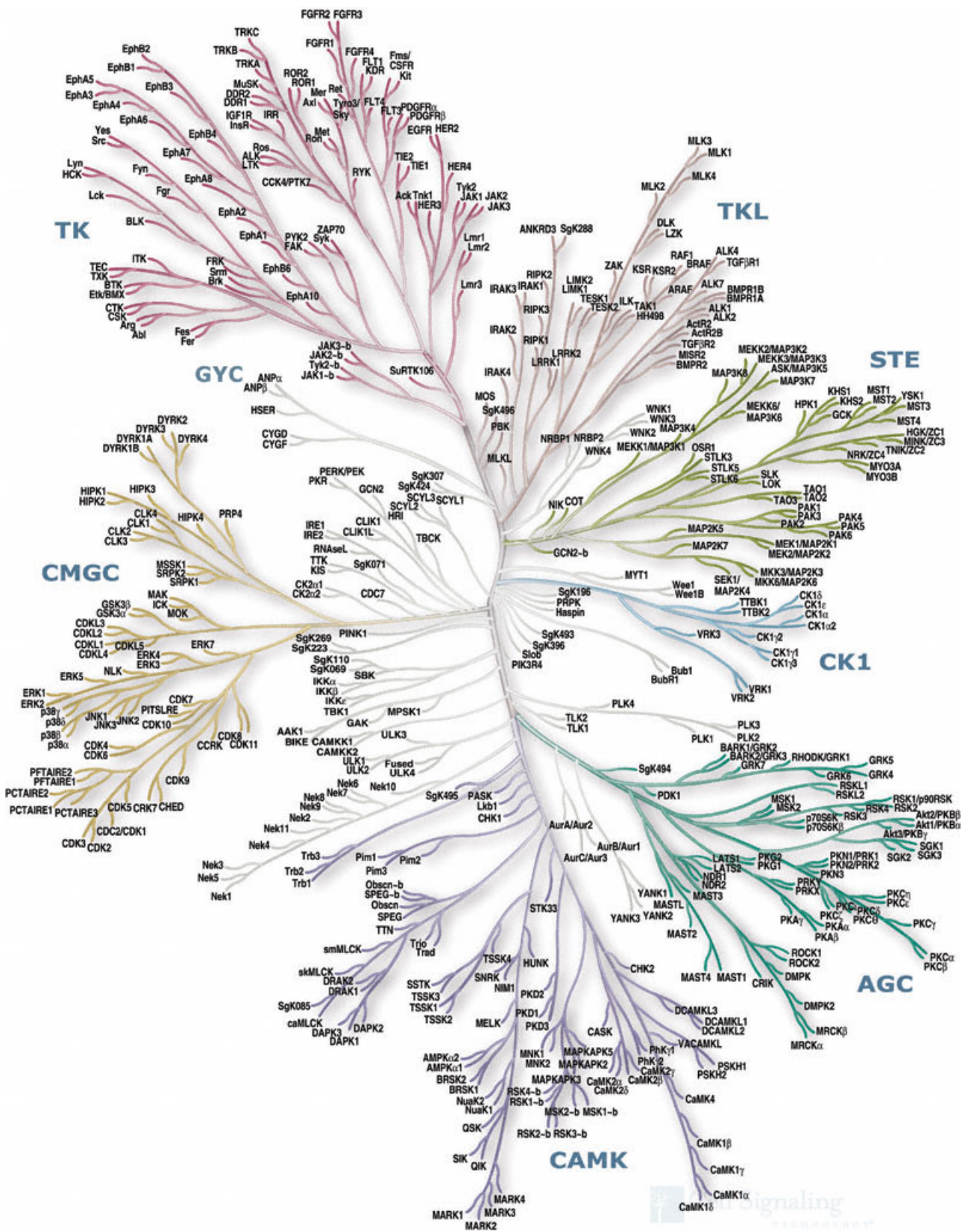


Figura 2.1. Dendrograma del kinome (Manning et al., 2002). Les cinases estan agrupades en diferents famílies.

un motiu d'unió a la ciclina A anomenats pèptids PEN-RXL, fusionats a una seqüència d'*antennapedia* (PEN) per millorar-ne la permeabilització cel·lular. El domini RXL és present en varies proteïnes que són substrats de CDK2/ciclina A i és per això que aquests pèptids es mostren eficients per inhibir en assajos "in vitro" la fosforilació de substrats amb aquest domini. El factor de transcripció E2F conté un domini RXL. E2F indueix l'expressió de gens de la fase S fins que és fosforilat pel complex CDK2/ciclina A, la qual cosa impedeix la seua capacitat d'unió a l'ADN i, per tant, la seua funció transcripcional. La mutació inactivadora de Rb acompanyada de l'activació massiva d'E2F alteren la progressió normal del cicle i induïxen l'apoptosi. Quan Mendoza i col·laboradors van testar els efectes dels pèptids PEN-RXL sobre diverses línies cel·lulars amb la via de Rb inactivada o amb un excés de fosforilació de Rb, van observar que s'induïa mort. Experiments paral·lels es van realitzar en models "in vivo" obtenint-se com a resultat una inhibició del creixement del tumor i presència de mort apoptòtica. Aquests resultats anaven en la direcció de les observacions de Chen et al. (1999), les quals suggerien que la desregulació d'E2F i la inactivació de CDK2/ciclina A eren sinèrgicament letals (veieu l'apartat 7.3.1). Els resultats de Mendoza i col·laboradors indiquen que futurament els inhibidors basats en la seqüència RXL poden proporcionar fàrmacs específics pels tumors amb alteracions en la via Rb/ciclina D.

Gondeau et al. (2005) van sintetitzar un petit pèptid anomenat C4, que derivava de la seqüència d'aminoàcids de la ciclina A. Van demostrar que aquest pèptid no interferia amb la formació del complex CDK2/ciclina A sinó que entrava en competició amb alguns dels seus substrats. És més, l'ús de C4 acoblat al domini de transducció de proteïnes derivat de la proteïna Tat del virus de l'immunodeficiència humana adquirida (TAT), es mostrava eficaç per bloquejar la proliferació de línies cel·lulars tumorals.

Fàrmacs inhibidors de les CDKs antagonistes de l'ATP. Els compostos amb activitat inhibidora de CDKs a través de la competició pel lloc d'unió de l'ATP, presenten estructures químiques molt diverses. Entre ells trobem els derivats purínics (grup al que pertany l'olomoucina i la roscovitina, dues purines trisubstituïdes), les pirimidines, els flavonoides (entre els quals trobem el flavopiridol), els oxindols (grup al que pertanyen les indirubines), les diarilurees, els derivats d'estaurosporina, diversos compostos amb heterocicles, etc (Fischer et al., 2003a). Aquests inhibidors farmacològics de CDKs, malgrat presentar una gran diversitat química, són molècules de baix pes molecular. Presenten una estructura comuna formada per heterocicles plans, hidrofòbics, i s'uneixen a través de dos a tres ponts d'hidrogen, amb la Leu⁸³ i el Glu⁸¹ del lloc d'unió de l'ATP a la CDK. Els enllaços químics entre aquests inhibidors i la cinasa s'estableixen principalment per interaccions hidrofòbiques i ponts d'hidrogen (Knockaert et al., 2002).

Els inhibidors de CDKs es poden classificar segons la seua selectivitat (consulteu la taula II. Els de la primera generació que són altament inespecífics i que podríem anomenar "pan-inhibidors de CDKs",

els de segona generació que inhibeixen la CDK1, 2 i 5 (i que en alguns casos també poden inhibir algunes CDKs implicades en transcripció com la CDK7 i la 9) i, finalment, els de tercera generació que han estat sintetitzats amb la finalitat d'ésser més selectius. De totes maneres, fins ara, no s'ha aconseguit sintetitzar inhibidors específics d'una sola CDK. La manca d'aquests inhibidors específics, seria explicable per l'alta conservació dels residus que formen el domini d'unió de l'ATP entre les diverses CDKs (Knockaert et al., 2002).

Les purines trisubstituïdes formen part d'una família de compostos amb una estructura semblant a l'adenina de l'ATP. El seu mecanisme d'acció és, per tant, el de competir amb l'ATP pel seu lloc d'unió a la CDK. Dins de la família es troben l'olomoucina i la roscovitina, dos dels fàrmacs estudiats en aquesta tesi.

2.1 ELS DERIVATS PURÍNICS

2.1.1 Aparició i estudis cristal·logràfics

La família de derivats purínics apareix quan es van evidenciar els efectes inhibidors sobre les CDKs de la 6-dimetilamino purina. Aquest compost es pot considerar el cap de sèrie de la família. El pas següent per ampliar una família de fàrmacs amb compostos més actius, més selectius o més estables, sol ser l'obtenció de nous derivats per síntesi química clàssica o combinatòria. Aquest punt es recolza en estudis d'estructura/activitat i de modelització molecular. Les estructures cristal·lines proporcionen informació del mecanisme d'acció dels compostos i de la seua selectivitat. Per exemple el grup de Sug-Hou Kim va cocrystal·litzar l'olomoucina i l'isopenteniladenina amb la CDK2 (Schulze-Gahmen et al., 1995). Sorprenentment van observar que l'orientació de l'anell purínic d'aquests compostos en el domini d'unió a la cinasa era diferent de la de l'ATP. Posteriorment altres compostos amb activitat inhibidora de CDKs han estat cocrystal·litzats amb la CDK2 i s'ha vist que l'anell purínic de la roscovitina, dels purvalanols i d'altres purines, presenta la mateixa orientació que l'olomoucina dins del lloc d'unió a la CDK2; tanmateix no tots els fàrmacs derivats de purines trisubstituïdes comparteixen aquesta característica ja que altres compostos relacionats estructuralment amb els anteriors, per exemple NU2058 o NU6102, presenten una orientació diferent. En el cas de les imatges dels cristalls de CDK2 amb l'ATP i amb compostos derivats purínics també s'ha revelat que els inhibidors estudiats s'uneixen al solc situat entre els dominis N- i C-terminal de la cinasa, lloc que normalment és ocupat per l'anell d'adenina de l'ATP. L'anell planar heterocíclic comú en aquests inhibidors, ocupa en tots els casos el lloc hidrofòbic delimitat per Ile¹⁰, Val¹⁸, Phe⁸² i Leu¹³⁴. Els aminoàcids Ile¹⁰, Leu⁸³ i Leu¹³⁴ són responsables del 40% dels contactes entre la CDK i els inhibidors. Els ponts d'hidrogen que es produeixen entre la molècula d'inhibidor i els

residus Glu⁸¹ i Leu⁸³ de la cinasa són un fenomen constant entre els diferents membres de la família de les CDKs (Meijer, 2000).

El coneixement que es té de l'activació de la CDK5 unida a p25, que a diferència dels complexos formats per la CDK2, no requereix la fosforilació del llaç T, feia de gran interès l'obtenció de cristalls d'elevada difractància pel complex CDK5/p25. La informació obtinguda serviria pel disseny de fàrmacs dirigits a inhibir específicament la CDK5. Augments de l'activitat d'aquesta cinasa han estat observats en múltiples malalties neurodegeneratives, per exemple en l'Alzheimer o l'esclerosi lateral amiotròfica, etc. En el decurs del 2005, s'ha obtingut l'estructura cristal·lina de la R-roscovitina i d'altres fàrmacs inhibidors, unida a la CDK5/p25 (Mapelli et al., 2005). Aquests resultats proporcionen una nova eina per l'estudi de les bases estructurals de les interaccions entre les CDKs i els inhibidors, complementària a l'obtinguda amb la cocrystal·lització de la CDK2.

De forma general, el coneixement actual de les interaccions entre les CDKs i molts dels inhibidors farmacològics de les CDKs, suggereix que la selectivitat dels inhibidors es produeix per la interacció dels fàrmacs amb aminoàcids conservats entre les diferents CDKs, però diferents de les altres cinases. Aquests residus aminoacídics tampoc interaccionen amb l'ATP. En resum, les estructures cristal·logràfiques de les CDKs amb els diferents inhibidors, que es poden acomodar en el seu lloc d'unió a l'ATP, proporcionen informació per tal de millorar l'afinitat o alterar l'especificitat dels nous inhibidors.

2.1.2 Estudis de l'eficàcia enfront de la selectivitat

La identificació i optimització dels inhibidors de CDKs s'inicia amb una etapa de clivatge de les col·leccions de compostos, en el decurs de la qual, les molècules candidates són sotmeses a assajos que permeten d'avaluar successivament dos dels criteris principals, la seua eficàcia i la seua selectivitat. El fet que el complex CDK1/ciclina B fos fàcil d'obtenir en grans quantitats a partir d'extractes d'òcit d'estrella de mar (Rialet i Meijer, 1991), explica històricament que l'eficàcia d'aquests compostos es testés en aquest sistema. Aquesta aproximació experimental caracteritza l'estudi dels derivats purínics realitzats en el grup del Dr. Meijer. Els assajos d'activitat cinasa consisteixen en ficar l'enzim (en aquest cas el complex CDK/ciclina) en presència d'ATP marcat amb un isòtop radioactiu del fòsfor (P^{32}) i un substrat adequat (com la histona H1, Rb, etc). L'activitat enzimàtica es mesura per la quantitat de fòsfor radioactiu incorporat al substrat. Posteriorment, s'afegeixen concentracions creixents de l'inhibidor potencial i es mesura l'inhibició de l'activitat cinasa. Les corbes de dosi-resposta que s'obtenen d'aquests experiments serveixen per definir la IC_{50} "in vitro" i realitzar, a través d'aquest paràmetre, comparacions de l'eficàcia entre diferents fàrmacs inhibidors. Quan un compost presenta una IC_{50} interessant en el primer test d'eficàcia, se'l sotmet a un segona sèrie de tests per avaluar la seua selectivitat. La selecti-

vitat d'un compost mesura la seua capacitat per ser actiu sobre altres cinases diferents de la inicialment descrita. Habitualment, es testa a través d'assajos d'activitat enzimàtica sobre amplis ventalls de cinases. A diferència de l'eficàcia, la mesura de la selectivitat no és precisa ja que depèn de paràmetres com l'espectre de cinases testades o l'allunyament d'aquestes cinases de la diana inicial. En aquest sentit, la tecnologia recombinant aplicada a diversos models (els llevats, les cèl·lules d'insecte, etc) ha permès la síntesi a gran escala d'un ampli ventall de cinases i àdhuc de les seues proteïnes activadores. Com a crítica a la mesura de la selectivitat, s'observa el fet que els panells de cinases utilitzats solen contenir pocs enzims en relació a totes les cinases presents al *kinome* humà (veieu l'apartat 2.4) i que a més, no s'inclouen proteïnes diferents a les cinases, per exemple fosfatases, enzims del metabolisme de les purines, etc. El mètode de la cromatografia d'afinitat ha estat incorporat a l'estudi de la selectivitat d'aquests compostos (Knockaert et al., 2000). El coneixement de l'orientació del compost dins del lloc d'unió de l'ATP permet l'addició dirigida d'un braç, a través del qual, l'inhibidor quedarà unit a una matriu sòlida. L'inhibidor, així immobilitzat, és utilitzat com una matriu cromatogràfica dirigida a purificar les proteïnes d'un extracte cel·lular que hi interaccionin. Finalment, les proteïnes unides a la matriu són eluïdes, es resolen en un gel d'acrilamida i s'identifiquen per microseqüenciació dels seus pèptids interns. Gràcies a aquest mètode, es va confirmar que CDK1, 2, 5 i 7, però que també Erk 1 i 2, són dianes del purvalanol (Knockaert et al., 2000; Knockaert et al., 2002b). Una altra aproximació per determinar la selectivitat d'un compost és el *yeast triple hybrid system* (veieu la figura 2.2). Aquesta aproximació ha estat aplicada a l'estudi de les dianes del purvalanol i de la R-roscovitina (Becker et al., 2004). La tècnica consisteix en utilitzar el fàrmac com a pont entre una proteïna amb un domini d'unió a l'ADN (DBM) i les proteïnes d'una llibreria d'ADN unides a un domini activador de la transcripció (AD). L'expressió proteica resultant de l'heterodimerització del fàrmac amb les proteïnes del sistema, confereix una nova característica a les cèl·lules, per exemple el creixement en un medi auxotròfic. Alternativament, s'ha descrit un nou mètode "in vitro" que quantifica l'afinitat de diversos inhibidors de CDKs pel lloc d'unió de l'ATP de 113 cinases diferents (veieu la figura 2.3). El sistema requereix, en primer lloc, una matriu on s'immobilitza el lligam que competeix pel lloc d'unió de l'ATP i, en segon lloc, l'expressió de les 119 cinases unides a un *tag*. El *tag* serveix per millorar l'expressió de les cinases, la purificació i la detecció. El mètode consisteix en ficar en contacte el fàrmac inhibidor amb els dos anteriors membres del sistema i quantificar la disminució de l'unió entre la cinasa i el lligam (Fabian et al., 2005).

Els derivats de les purines semblen selectius en comparació als compostos de generacions prèvies, com per exemple, el flavopiridol. Aquests derivats de purines actuen inhibint la CDK1, 2, 5, 7 i 9 però no la CDK4 ni la 6 (Meijer et al., 1997). En concret, en el cas de la R-roscovitina, un dels estereoisòmers de la roscovitina, la combinació dels diferents mètodes descrits a l'anterior paràgraf, ha revelat que com s'havia enunciat en un principi, la roscovitina presenta una elevada selectivitat. Les IC_{50} de la R-

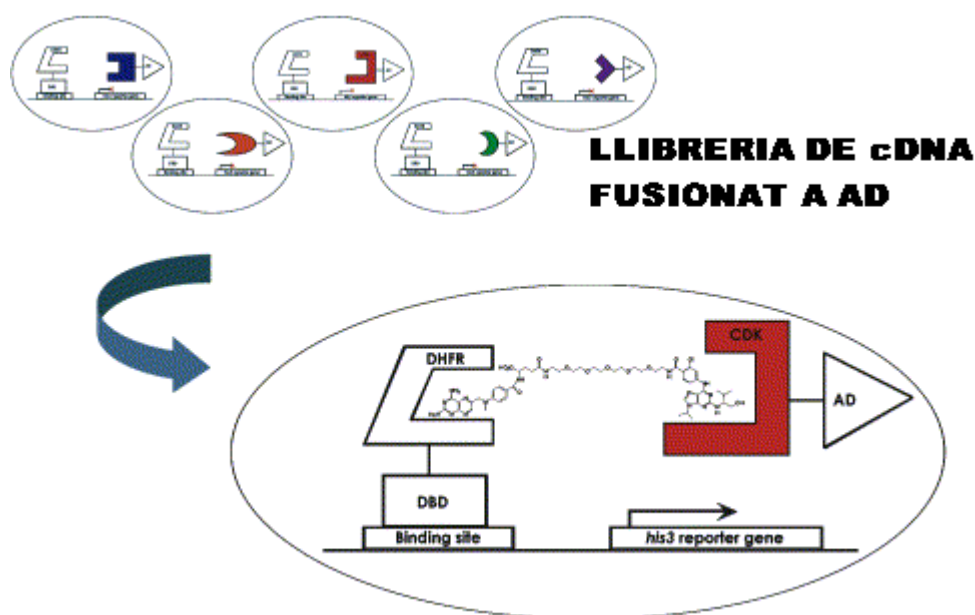


Figura 2.2. Determinació de la selectivitat d'un compost pel yeast triple hybrid system segons Becker et al., (2004). Aquesta imatge il·lustra com es testa l'interacció d'una molècula problema amb les diferents proteïnes provinents d'una llibreria de cADN unides a AD (*activation domain*). La positivació de la interacció suposarà la transcripció d'un gen sota la regulació d'una proteïna que conté un DBD (*DNA binding domain*).

roscovitina estan per sota de $1\mu\text{M}$ en el cas de CDK1, 2, 5, 7 i 9. En canvi, les IC_{50} de CDK4, 6 i 8 estan aproximadament 2 ordres de magnitud per sobre. Altres cinases són inhibibles a dosis entre 1 i $40\mu\text{M}$ (CaM Kinase 2, $\text{CK1}\alpha$, $\text{CK1}\delta$, DYRK1A, EPHB2, ERK1, ERK2, FAK i IRAK4). Les cinases que han estat testades representen un 28,4% de la totalitat del *kinome* i s'han obviat altres proteïnes que sense ser proteïna-cinases, utilitzen l'ATP, el GTP o el NAD (Bach et al., 2005). Un exemple és el cas de la cinasa de pirodoxal (PDXK). La PDXK és un enzim que catalitza la fosforilació del pirodoxal, la pirodoxamina i la pirodoxina en presència d'ATP i Zn^{2+} . Aquest fet és essencial per la formació de la forma activa de la vitamina B6 que és un cofactor clau per l'activació de 140 enzims diferents. Mitjançant la cromatografia d'afinitat, es va evidenciar que la PDXK interactua amb la R-roscovitina, també s'ha observat que l'enzim és inhibit quan el fàrmac es situa al lloc d'unió del pirodoxal i darrerament s'ha obtingut l'estructura cristal·logràfica del complex format per la PDXK i la roscovitina (Tang et al., 2005).

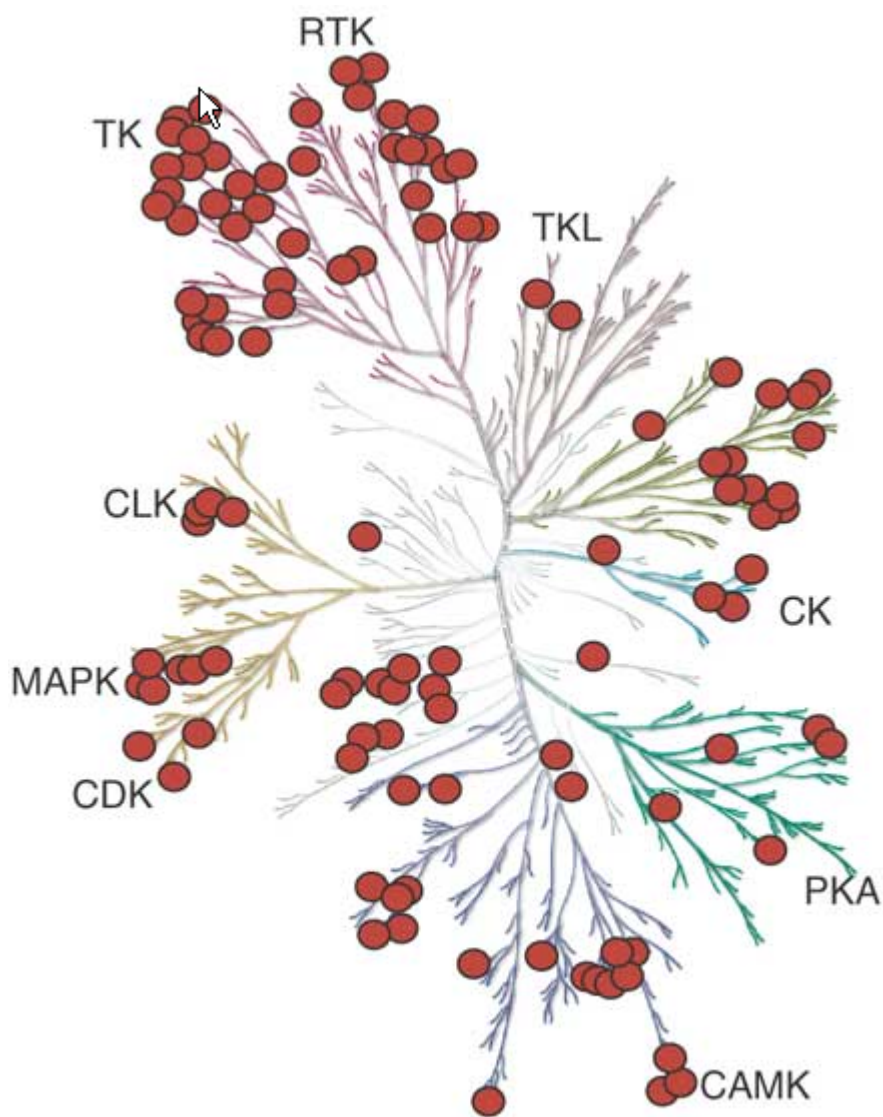


Figura 2.3. Mapa del kinome representant les 113 proteïna-cinases estudiades en assajos de competició a través del lloc d'unió de l'ATP segons Fabian et al., (2005). El dendrograma de les proteïna-cinases és una simplificació de l'original, representant la totalitat del *kinome*. Cadascuna de les cinases testades ha estat marcada amb un cercle vermell.

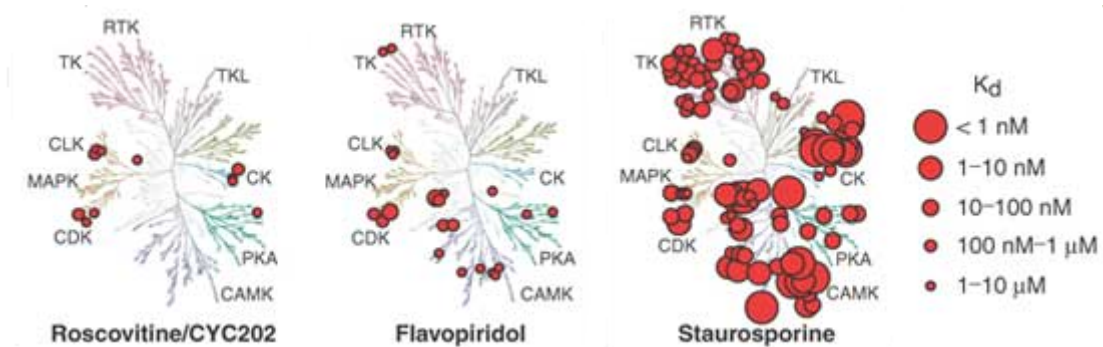


Figura 2.4. Mapa del kinome representant les 113 proteïna-cinases estudiades en assajos de competició a través del lloc d'unió de l'ATP per la R-roscovitina, el flavopiridol i l'estaurosporina segons Fabian et al., (2005). Els tres dendrogrames presentats han estat simplificats respecte la totalitat del kinome. La llegenda de la dreta indica en funció del tamany del cercle vermell, la concentració necessària dels compostos per inhibir la cinasa en qüestió. Les imatges exemplifiquen com a través d'aquestos assajos s'ha observat que la R-roscovitina és especialment selectiva respecte el flavopiridol i que l'estaurosporina és un inhibidor d'ampli aspectre.

2.2 OLOMOUCINA I ROSCOVITINA

La roscovitina i l'olomoucina són dos anàlegs de purina 2,6,9-trisubstituïts (concretament al carboni 2, i als àtoms de nitrogen 6 i 9). Es disposa comercialment d'un anàleg metilat de l'olomoucina anomenat iso-olomoucina. Aquesta metilació és responsable d'una disminució de la potència, fet que l'habilita com a control negatiu dels efectes biològics de l'olomoucina. La roscovitina presenta un carboni asimètric a la seua estructura, fet que determina que es disposi de dos estereoisòmers, la R-roscovitina i la S-roscovitina. La forma R és lleugerament més activa inhibint les CDKs (de Azevedo et al., 1997). Per aquest motiu, la majoria dels estudis amb aquest fàrmac han estat realitzats amb la R-roscovitina. En aquests moments, es realitzen assaigs clínics amb la R-roscovitina que es troben en fase II en el cas del càncer i en fase I per la glomerulonefritis. La R-roscovitina ha estat també anomenada Cyc202 (codi de la indústria farmacèutica) i Selecciclib® (nom genèric).

2.2.1 Introducció històrica

A continuació farem un repàs històric al descobriment de les purines trisubstituïdes basant-nos en una revisió (Meijer i Raymond, 2003). L'esdeveniment clau pel desenvolupament d'aquests fàrmacs fou el descobriment d'un model idoni per estudiar les fosforilacions que es produïen durant el pas de profase a metafase del cicle cel·lular. El model d'estrella de mar que Laurent Meijer utilitzava al laboratori de Pierre Guerrier de la *Station Biologique de Roscoff* era suficientment simple per assentar les bases d'aquest estudi. Més endavant, a finals de la dècada del 1980, el mateix Meijer juntament amb Steven Pelech, purificarien i identificarien la cinasa de fase M específica d'histona. Aquest enzim es va descriure com un

heterodímer de CDK1 amb la ciclina B i presentava una homologia total amb la proteïna MPF descoberta 2 anys més tard.

L'ús dels oòcits provinents de l'estrella de mar va oferir una font abundant de CDK1/ciclina B en forma de complex actiu. Després de la purificació d'aquest complex per cromatografia d'afinitat, es va establir un assaig simple d'activitat cinasa que serviria de base per la detecció de possibles inhibidors de l'activitat del MPF. La seua selectivitat s'avaluava inicialment en comparació a la d'una sèrie d'agents quimioterapèutics d'ús comú en clínica (que resultaven ser inactius en l'assaig) i a la de l'estaurosporina (STS), un inhibidor altament inespecífic i molt potent de proteïna-cinases, que presentava una gran potència per inhibir l'activitat de la cinasa.

Juntament a la STS, la 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) era un inhibidor inespecífic de cinases àmpliament utilitzat durant la dècada del 1980. Aquest derivat purínic sintetitzat per Lionel Rebhun presentava la particularitat d'inhibir la mitosi de l'embrió de les orquídies marines sense frenar la síntesi proteica. Animats pels resultats inhibitoris en assajos d'activitat cinasa, es va estendre l'estudi a d'altres purines relacionades, destacant els resultats de la isopenteniladenina. L'isopenteniladenina és una hormona vegetal (citocinina) àmpliament estudiada que va introduir en el panorama dels inhibidors de CDKs a Jaroslav Vesely i Miroslav Strnad. Durant l'estada al laboratori de Roscoff van testar els membres disponibles de la família d'anàlegs d'isopenteniladenina i altres purines trisubstituïdes en l'assaig d'activitat CDK1/ciclina B. En el decurs d'aquests assajos es descobrí l'anomenada olomoucina (el nom fa referència a Olomouc, la universitat d'origen de Jaroslav Vesely a la República Txeca). Pertanyent a la família de purines trisubstituïdes, aquest compost estava ja disponible comercialment com antagonista d'una citocinina vegetal. David Lethan l'havia sintetitzat per primer cop a Canberra (Austràlia) i, juntament a Lionel Redhun, poden ser considerats els antecedents més remots de les purines com a inhibidores de cinases.

L'interès de l'olomoucina en comparació amb altres purines predecessores, va ser elevat. D'una banda era més potent i, a més a més, mostrava més especificitat per un determinat grup de cinases, les CDKs, i en menor mesura per les MAPKs. Aquest fet va ser sorprenent ja que anava en contra del dogma de que mai s'obtindria especificitat amb inhibidors que tinguessin com diana el domini d'unió de l'ATP. Estudis d'activitat de 81 derivats de purines diferents van demostrar que l'activitat inhibidora de cinases era prominent a la subfamília de purines 2,6,9-trisubstituïdes (Vesely et al., 1994).

A partir d'aquí, les col·laboracions amb Miroslav Strnad i més endavant amb Michel Legraverend, van dur a la síntesi de la roscovitina, nom que fa referència a Roscoff, el lloc on es va sintetitzar per primer cop el compost. Aquest esdeveniment va emfatitzar l'interès dels anàlegs de purina en química mèdica i va donar el tret de sortida a una carrera per aconseguir compostos químics de la mateixa família

cada cop més específics i potents. Aquesta carrera es va accelerar amb els resultats de la cocristal·lització de l'olomoucina o de la roscovitina unides amb la CDK2. A partir d'aquests esdeveniments molts altres laboratoris han sintetitzat compostos relacionats amb les purines i que han vingut a confirmar els resultats previs amb les purines trisubstituïdes. Entre ells destaquem el de Nathanael Gray per haver sintetitzat els purvalanols, que són fàrmacs de la família de les purines trisubstituïdes molt potents "in vitro" (Meijer i Raymond, 2003).

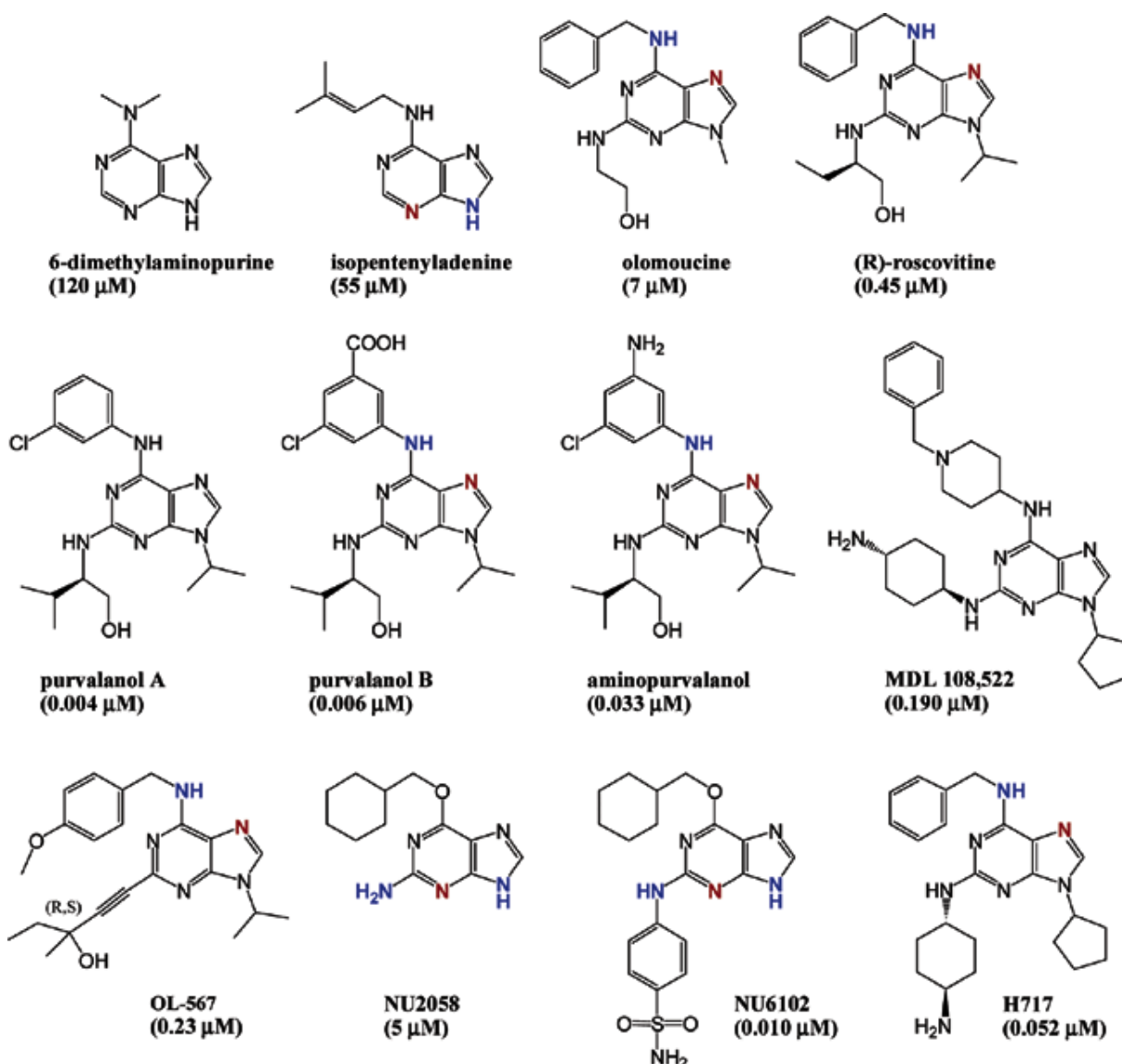


Figura 2.5. Estructura de diversos compostos inhibidors de CDKs segons Meijer i Raymond (2003). Observem com tots aquests compostos presenten un anell purínic en la seua estructura. Per aquells compostos que han estat cocristal·litzats amb la CDK2, els dos o tres àtoms que interaccionen amb els àtoms de nitrogen i oxigen de la leucina 83 (Leu83) i el glutàmic (Glu81) han estat marcats en vermell en el cas dels acceptors d'hidrogen i en blau si són donadors d'hidrogen. Els valors de IC₅₀ per CDK1/ciclina B es troben indicats sota cada compost. En el cas de MDL108,522 és CDK2/ciclina E (Meijer i Raymond, 2003).

2.2.2 Efectes cel·lulars

Els efectes cel·lulars d'un fàrmac depenen en gran part del seu mecanisme d'acció, és a dir, de la diàna o dianes inhibides pel fàrmac. En tests "in vitro" s'ha observat que aquests fàrmacs són selectius, però existeix el dubte de si aquesta selectivitat és extrapolable als sistemes "in vivo" (veieu l'apartat 2.1.2). En aquestes condicions existeixen diversos factors capaços de modificar els efectes cel·lulars d'un fàrmac, com per exemple: la permeabilitat de la membrana, l'acumulació diferencial a compartiments intracel·lulars, la biotransformació, o bé, en el nostre cas, la competència amb concentracions intracel·lulars altes d'ATP, la unió a dianes desconegudes, etc. Per tots aquests motius, els resultats obtinguts en estudis "in vivo" han d'ésser interpretats amb precaució. Per exemple, si tractem amb inhibidors de CDKs, les dianes de les CDKs han de deixar d'estar fosforilades. La informació aportada per estudis paral·lels amb inhibidors d'estructures químiques allunyades han d'aportar resultats similars. La utilització simultània d'isòmers de baixa potència farmacològica, i per tant, inactius en el mateix rang de concentracions, no han de donar els efectes observats amb els fàrmacs actius. L'estudi de dominants negatius, la sobreexpressió dels inhibidors naturals de CDKs (CKIs), la microinjecció d'anticossos inactivadors de CDK1 i 2 i altres metodologies com la de l'antisentit o la de l'ARN d'interferència (RNAi), han de permetre completar el nostre coneixement dels efectes d'aquests fàrmacs.

D'una forma general, les dades bibliogràfiques convergeixen en afirmar que els efectes cel·lulars dels inhibidors de CDKs són :

1. **Inhibició de la proliferació i aturada de la cèl·lula en fase G1 o G2 del cicle cel·lular.** Aquests efectes són essencialment conseqüència de la inhibició de CDK1 i 2, però també hi podria haver una part de l'efecte atribuïble a la inhibició de Erk1 i 2. Els factors de creixement promouen l'activació i l'acumulació nuclear de les Erk durant tota la fase G1 i aquest fet correlaciona amb l'entrada en cicle (Pouyssegur et al., 2002). Maude i Enders (2005) proposen un nou mecanisme antiproliferatiu per l'olomoucina i la roscovitina. Mostren que la inhibició de les CDKs desencadena una disminució dels nivells de Chk1 i que, a través d'aquest efecte, s'indueix una àmplia resposta de dany a l'ADN marcada per l'activació de ATM i Chk2. Quant a les fases del cicle on s'acumulen les cèl·lules en resposta al tractament, la parada en G1 observada amb aquests fàrmacs s'acompanya d'una disminució de la fosforilació de Rb (Kitagawa et al, 1993; Whittaker et al., 2004), explicable per la inhibició de CDK2. Alternativament, la parada en G2/M es produeix al mateix temps que la reducció de la fosforilació de la vimentina i de la nucleolina, fets atribuïbles a l'inhibició de CDK1/ciclina B (Meijer et al., 1997). Schutte et al. (1997) demostren que l'olomoucina i la roscovitina indueixen una inhibició dosi-dependent de la transició de G1/S, G2/M i de la progressió en S en dues línies tumorals diferents. És més, a dosis de 200 μ M per l'olomoucina i 40 μ M per la

roscovitina, el cicle està completament aturat i s'observa l'aparició de cèl·lules apoptòtiques.

- 2. Els inhibidors farmacològics de CDKs indueixen apoptosi per sí mateixos i són sinèrgics amb altres fàrmacs inductors d'apoptosi.** David-Pfeuty (1999) realitzà uns treballs pioners utilitzant fibroblasts humans no transformats i les MCF-7, una línia derivada de càncer de mama. Els tractaments amb olomoucina o roscovitina induïen toxicitat d'una forma molt ràpida en la línia tumoral i d'una forma més gradual en els fibroblasts. A més a més, la mort es produïa des de qualsevol fase del cicle. S'observà que els dos fàrmacs induïen un augment dels nivells de proteïna de p53 i una deslocalització de la nucleolina del nuclèol tant en les MCF-7 com en els fibroblasts. Aquests esdeveniments culminaven en una fragmentació gairebé completa del nuclèol i suggerien que la CDK2 podria estar implicada en el control dels nivells de p53 i també en la integritat i funció nucleolar.

En un nombre determinat de models, s'ha observat que les purines trisubstituïdes en combinació amb altres tractaments poden induir apoptosi en cèl·lules mitòtiques. Per exemple, l'olomoucina i la roscovitina presenten efectes sinèrgics amb els inhibidors de les farsenesil transferases a l'hora d'induir apoptosi en algunes línies tumorals humanes (Edamatsu et al., 2000). La roscovitina i l'inhibidor de la PI3K, LY294002, són sinèrgics en la inducció d'apoptosi en línies leucèmiques humanes (Yu et al., 2003). La combinació de purvalanol A i taxol provoca una apoptosi massiva en les cèl·lules Hela (O'Connor et al., 2002).

Finalment, Bach et al. (2005) han estudiat els efectes del tractament amb R-roscovitina de MEFs CDK2 -/- versus els salvatges (CDK2+/+). La disminució de la viabilitat mesurada per MTT després de 96 hores de tractament, ha permès calcular els valors de IC₅₀ que són de 26 μM (CDK2+/+) i 50 μM (CDK2-/-). Aquest fet suggereix que la inhibició de la CDK2 només és responsable d'una petita part de la disminució de la viabilitat. A més, l'anàlisi del cicle ha estat conclouent per demostrar que la presència de CDK2 és necessària per l'acumulació de cèl·lules en fase S en resposta al tractament amb R-roscovitina.

- 3. Inhibició de la transcripció.** El tractament amb roscovitina, contràriament al realitzat amb flavopiridol, no comporta una pèrdua global de la transcripció del mRNA. Algunes observacions mostren una reducció de la síntesi de mRNA de només el 65%, existint una població remanent d'ARNm resistents a aquesta inhibició (Ljungman i Paulsen, 2001).

Whittaker i els seus col·legues (2004) estudien els efectes de la R-roscovitina sobre diverses línies tumorals de còlon. En aquest models la R-roscovitina no indueix mort apoptòtica, però sí la reducció de la proliferació, cel·lular, la disminució de la fosforilació de la proteïna Rb i de la transcripció del mRNA. A nivell del cicle, observen una disminució de les cèl·lules en G1, de la incorporació de bromodeoxiuridina durant la fase S i un augment de la fase G2/M. Descriuen que la R-roscovitina

indueix la via de les MAPK, en concret s'observa un augment de la fosforilació de les ERK1 i 2, i l'activació del factor de transcripció ELK-1, regulat per les anteriors cinases. L'activació de les ERKs és independent dels efectes del compost sobre el cicle cel·lular. Malgrat aquesta activació, observen una disminució de la ciclina D1 paral·lela als efectes anteriorment descrits. L'exploració de la via de la p38SAPK i de la PI3K evidencia que aquestes cinases no estan implicades en la disminució de la ciclina. La disminució de la ciclina D1 es precedeix d'una disminució del seu mRNA, també disminueix l'ARN de la ciclina A i la B1, però no el de c-FOS que augmenta dues vegades. Aquest fet s'acompanyava de la disminució de la fosforilació de la RNA polimerasa II i dels seus nivells de proteïna, suggerint que la R-roscovitina podria actuar inhibint els complexos de la CDK7 i la CDK9. Alternativament, Whittaker i els seus col·legues proposen que la R-roscovitina podria estar inhibint indirectament la CDK4 i la CDK1 a través de la disminució de les seues ciclins, fet que explicaria la reducció de fosforilació de Rb en múltiples llocs i la parada en totes les fases del cicle. Aquest mateix grup mostra també que l'olomoucina, a l'igual que la R-roscovitina, disminueix la fosforilació de Rb, els nivells proteics de Rb i la ciclina D1. Igualment, activa la fosforilació de la Erk 1 i 2.

4. **Diferenciació en un baix nombre de models.** Aquests fàrmacs poden induir diferenciació en alguns models cel·lulars, encara que el mecanisme utilitzat sigui essencialment desconegut. L'aminopurvalanol, per exemple, indueix la diferenciació d'una línia cel·lular derivada de una leucèmia mieloide (Rosania et al., 1999). Alternativament, s'ha vist que la inhibició conjunta de les activitats de CDK2 i CDK6 condueix a la diferenciació de certes línies eritroleucèmiques murines (Matushansky et al., 2000). Altres models, com el de les cèl·lules oligodendroglials, poden ser diferenciats per inhibidors farmacològics de CDKs (Nguyen et al., 2003). És més, també s'ha vist la inducció de diferenciació en resposta a la inhibició de les CDKs en cèl·lules de la oïda interna (Malgrange et al., 2003). El tractament de cèl·lules precursors neuronals amb olomoucina provoca l'enlentiment de la fase G1 i, finalment, la diferenciació (Calegari i Huttner, 2003). Concloïem que, com s'ha vist fins aquest moment, els fàrmacs inhibidors de CDKs són capaços d'induir la diferenciació de certes línies d'estirp neuronal o sanguínia.
5. **Protecció de la mort apoptòtica quan aquesta sembla dependre de l'activació de les CDKs (veieu l'apartat 4)**

2.2.3 Perspectives terapèutiques dels inhibidors de CDKs

Les perspectives terapèutiques d'aquests fàrmacs estan estretament relacionades amb els seus efectes cel·lulars. La teràpia antitumoral és la seua aplicació més òbvia en vista dels seus efectes citocides i ci-

tostàtics. El Seliciclib® (R-roscovitina) es troba en fase II d'assaig clínic en pacients afectats per càncer de pulmó diferent del de cèl·lules petites. Als efectes directes d'aquests fàrmacs sobre les cèl·lules tumorals, s'associarien efectes indirectes. Per exemple, la inhibició de la proliferació de cèl·lules endotelials, que és el fenomen de la neoangiogènesi tumoral.

Es contemplin també altres possibilitats que van molt més enllà de la terapèutica antitumoral (veieu la figura 2.6). Aquests fàrmacs són susceptibles de donar bons resultats en totes aquelles situacions patològiques on hi intervé un augment desproporcionat, sense ser tumoral, del nombre de cèl·lules. Dins d'aquest grup podem incloure l'aterosclerosi, la restenosi postangioplàstica, la glomerulonefritis (proliferació de les cèl·lules del glomèrul del ronyó), la psoriasi (proliferació de la capa basal de l'epidermis), etc.

Els virus necessiten de l'activitat CDK per la seua replicació, entre ells trobem els virus de la família de l'herpes (com per exemple: citomegalovirus, els herpes virus, els virus de la varicel·la Zoster). Alternativament, s'ha vist que durant la infecció per HIV, la proteïna Tat activa el complex CDK9/ciclina T. Per tant, una indicació antiviral per aquests compostos està en estudi.

Els inhibidors de CDKs poden tenir una aplicació en el control dels desordres neurodegeneratius com és el cas de l'Alzheimer. Hem esmentat abans que els inhibidors de CKDs rescaten en models d'apoptosi neuronal. En resum, els inhibidors farmacològics de CDKs tenen una aplicabilitat potencial en el tractament de les malalties neurodegeneratives.

Una altra aplicació potencial és l'ús d'aquests fàrmacs i dels seus derivats contra paràsits eucariotes com *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *microsporidia*, etc. La multiplicació i desenvolupament d'aquests paràsits depèn de l'activitat de CDKs o de cinases relacionades amb CDKs (CRKs). Les diferències entre les CDKs de l'hoste i del paràsit permetrien el disseny de fàrmacs amb una major especificitat per la inhibició de les cinases del paràsit.

Finalment, independentment de la indicació, és destacable un fet avantatjós des del punt de vista terapèutic. L'aparició de resistències enfront d'aquests fàrmacs és bastant improbable, ja que la regió d'unió al fàrmac és la mateixa que la de l'ATP. Conseqüentment, la pressió evolutiva sobre aquesta regió és petita i no es produiran fàcilment canvis que alterin l'afinitat del fàrmac per la seua diana (Meijer, 2000).

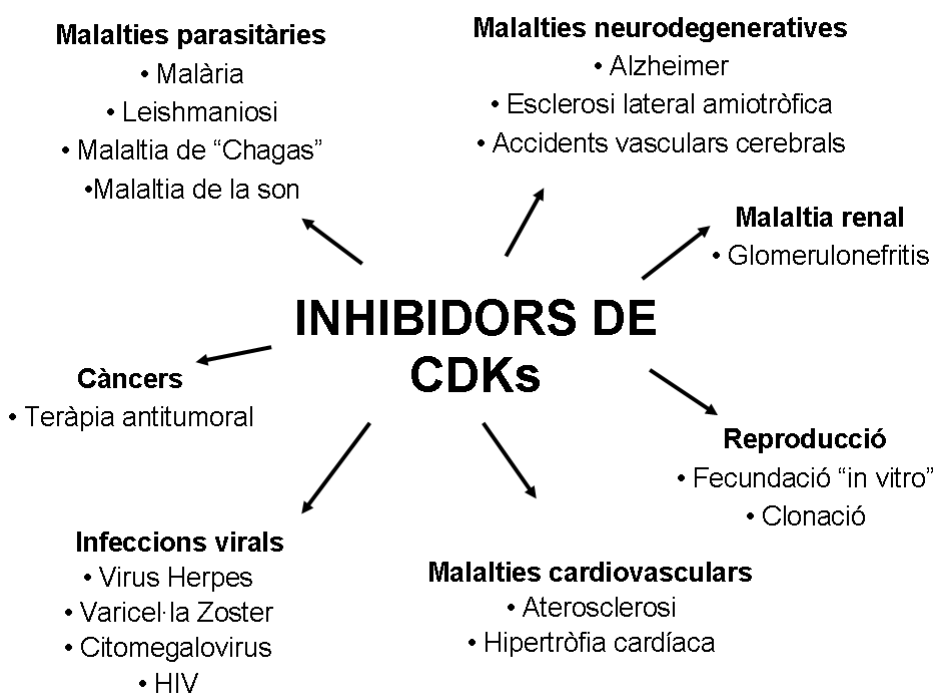


Figura 2.6. Perspectives terapèutiques dels inhibidors de CDKs. Les CDKs són proteïnes amb funcions molt diverses que van des de la proliferació fins a l'apoptosi, passant per la diferenciació o funcions concretes al sistema nerviós, com en el cas de la CDK5. Aquesta multiplicitat funcional fa preveure que els inhibidors de CDKs tindran nombroses aplicacions terapèutiques. *HIV*: virus de la immunodeficiència humana adquirida.

APOPTOSI

Els antecedents de l'estudi de la mort cel·lular apoptòtica es remunten al segle XIX, però no va ser fins al 1972 que es publica per primer cop un article utilitzant el terme "apoptosi". Els pares d'aquest terme són Kerr, Wyllie i Currie i sorgeix per tal d'anomenar un tipus de mort diferent al de la necrosi. Amb el temps, l'augment en el coneixement dels aspectes moleculars darrera del fenomen apoptòtic han fet que la seua definició, que al principi era purament morfològica, s'hagi anat elaborant i complicant. Prenem, per exemple, la mort induïda per l'estaurosporina (STS), un inductor clàssic d'apoptosi. Aquesta mort no presenta *blebbing*¹, una de les característiques morfològiques de la mort apoptòtica (Mills et al, 1998). En aquest cas, queda ben clar que a pesar de la falta de *blebbing*, la mort és apoptòtica. Precisament, la gran riquesa d'estímuls inductors de mort, la diversitat de models cel·lulars amb diferents fons genètics, i les eines farmacològiques capaces de frenar molts dels enzims claus en l'apoptosi (per exemple els diferents inhibidors de les caspases) fan necessari un replantejament del què és l'apoptosi. L'aparició de models de mort induïts amb diferents estímuls pro-apoptòtics, però on s'inhibien les caspases (Apaf-1/- o CASP3 -/-), i la constatació de que les cèl·lules seguien morint però amb un fenotip característic, va plantejar un problema semàntic pels diferents grups que treballaven en l'apoptosi. El grup de Kroemer va elaborar una classificació de la mort apoptòtica que principalment es fixava en la degradació de l'ADN i la compactació nuclear (Susin et al, 2000). Seguint aquesta classificació, l'**estadi I** es caracteritza per una fragmentació nuclear d'alt pes molecular (~50 Kb) i la condensació perifèrica de la cromatina, mentre que l'**estadi II** defineix un estadi de condensació cromatínica més pronunciat acompanyat per una fragmentació de l'ADN en escala (*ladder* en anglès). Els elements pivots bàsics de cadascun d'aquest estadis són les proteïnes AIF (*apoptosis inducing factor*) i CAD (*Caspase-3-activated DNase*), respectivament. Per deformació del llenguatge, molts grups han acabat parlant d'apoptosi de tipus I i d'apoptosi de tipus II, quan en realitat es referien a l'estadi I o II d'apoptosi. Alguns investigadors són més partidaris de resoldre el problema lingüístic utilitzant els termes d'apoptosi caspasa dependent i caspasa independent. Però fins a quin punt els fenotips que s'observen en certs models experimentals són apoptosis

¹Tret morfològic que es presenta durant l'apoptosi caracteritzat per una dinàmica formació de protusions a la membrana plasmàtica.

caspara independents? Creiem que, en alguns casos, es parla d'apoptosi caspara independent quan el que es pretén és dir que el fenotip que s'observa no és fruit de l'activació de les caspases efectores, és a dir, no s'està considerant la possible activació de la resta de la cascada de caspases. Per exemple, prenem el cas de la mort induïda per qualsevol fàrmac inductor d'apoptosi en les cèl·lules MCF-7, una línia derivada d'un tumor de mama defectiva en CASP3. El fenotip de mort serà defectiu en l'aparició de tots aquells elements dependents de l'activació de la CASP3 i, malgrat això, altres caspases s'han activat. En el grup de Farmacologia molecular preferim utilitzar el terme "apoptosi defectiva" enfront al "d'apoptosi canònica" ja que, per les anteriors raons, considerem que el terme caspara independent no és suficientment precís. Pensem que el terme apoptosi ("apoptosi canònica") s'hauria de reservar per designar el fenotip de mort cel·lular que és dependent de l'activació massiva de les caspases efectores.

La funció de l'apoptosi és variada i diferent segons l'edat de l'organisme. En el desenvolupament embrionari i fetal contribueix a donar la forma final de l'organisme, elimina les estructures redundants o innecessàries i confereix plasticitat a determinats teixits com per exemple el sistema nerviós central (SNC). En l'organisme adult, l'apoptosi és l'encarregada del manteniment de l'homeòstasi dels teixits diferenciats i té com objectiu el regular el balanç entre la proliferació i mort (Altieri DC, 2003).

3.1 LES CASPASES

Les caspases són la família d'enzims proteolítics clau en l'apoptosi. Són sintetitzades com precursors inactius o zimògens en la majoria de metazous nucleats. Actualment es coneixen 14 membres de la família (consulteu la taula 3.1). Les caspases tenen altres funcions a part de l'apoptòtica, així tenim el cas de les CASP1, 4, 5 i 11, que estan implicades en el fenomen de la inflamació. Per exemple, processen els precursors de certes citosines i indueixen l'aparició de les seues formes madures. Altres caspases s'han relacionat també amb el control de la proliferació i la progressió en el cicle cel·lular de les cèl·lules T (Los et al, 2001). En la mort apoptòtica, les caspases s'activen ordenadament en forma de cascada, definint dos tipus d'enzims segons el lloc que ocupin en aquesta cascada: les caspases iniciadores (CASP8, 9, 2 i 10) i les caspases efectores (CASP3, 6 i 7). En el cas de les caspases efectores, és ben conegut que s'activen per proteòlisi del seu zimogen i en el cas de les iniciadores, és necessari la integració d'aquestes caspases en complexos macromoleculars. El mecanisme precís d'activació serà descrit posteriorment, en concret, pels dos casos més significatius, el de la CASP8 i el de la CASP9.

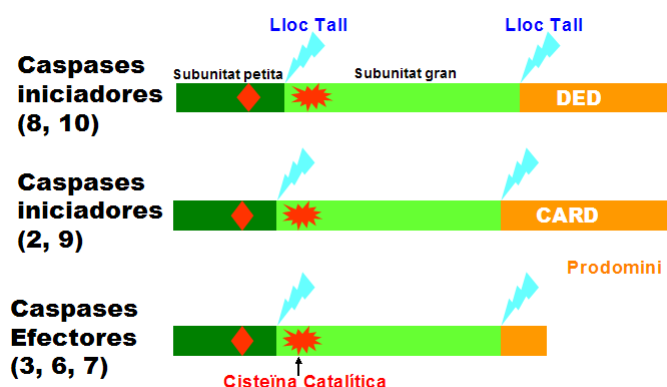


Figura 3.1. Esquema de l'estructura de les caspases iniciadores i efectores. El centre actiu de la caspasa està indicat en vermell.

Taula 3.1. Classificació i característiques de les caspases.

Caspasa	Altres noms	Seqüència preferent de tall	Motiu d'interacció	Notes
CASP1	ICE	WEDH	CARD	Està relacionada amb l'activació de citocines com la IL-1 β
CASP2	ICH-1/NEDD-2	DEHD	CARD	S'activa a través del domini CARD de RAIDD, una proteïna que s'associa al DISC de TNF-R
CASP3	CPP32/Yama/Apopaina	DEVD		Activada per la CASP8 o 9. Talla i activa altres caspases, ICAD, PARP
CASP4	ICRel-II/TX/ICH-2	(W/L)EHD	CARD	Subfamília de la CASP1 o de les caspases pro-inflamatòries
CASP5	ICRel-III	(W/L)EHD	CARD	Pertany a la subfamília de la CASP1

III – INTRODUCCIÓ

CASP6	Mch2a/proteasa de Làmina	VEHD		Activada per la CASP3, etc. Talla i activa altres caspases i proteïnes nuclears
CASP7	ICE-LAP3/Mch3/CMH1	DEVD		Activada per la CASP8. Talla i activa altres caspases o molècules relacionades com ICAD. Té una especificitat de substrat semblant a la CASP3.
CASP8	MACH/FLICE/Mch5	LETD	DED	Activada a nivell del DISC en la via de senyalització dels DRs. Activa altres caspases.
CASP9	ICE-LAP6/Mch6	LETD	CARD	Activada a nivell de l'apoptosoma després de la sortida de Cyt c. Activarà la CASP3.
CASP10	Mch4/FLICE-2		DED	Similar a la CASP8. S'activa en el DISC dels DRs. Activa altres caspases.
mCASP11	Ich-3		CARD	S'ha suggerit que és l'homòloga de la CASP4 humana.
mCASP12	Ich-4		CARD	De la subfamília de la CASP1. Localitzada a RE. S'ha implicat en l'apoptosi induïda per estrès del RE i de la proteïna β -amiloide.

CASP13	ERICE		CARD	De la subfamília de la CASP1, similar a la CASP4.
CASP14	MICE			Expressada específicament durant períodes del desenvolupament fetal.

3.1.1 Les caspases com proteases

Com el seu nom indica, el terme caspases agrupa a una família de cisteinproteases, és a dir, proteases que tenen en el seu centre catalític un residu de cisteïna i que tallen amb gran especificitat en un residu d'aspàrtic. D'aquí el terme **C** (cisteïna) **ASPASA** (proteasa que talla en aspàrtic).

Les caspases són sintetitzades sota la forma de proenzims. Les efectores s'activen a través del tall intern en un residu d'aspartat que habitualment és realitzat per altres caspases. En el cas de les caspases iniciadores, el mecanisme d'activació és més variable però en general es requereix la multimerització del proenzim. Les caspases iniciadores presenten una certa activitat catalítica basal en la seua forma no processada i la multimerització incrementa la seua activitat o facilita el processament.

Les tècniques de la cristal·lografia de raigs X han revelat que en general les caspases actives són un tetràmer format per dos dímers (veieu la figura 3.2). Cadascun d'ells està format per una subunitat gran i una de petita provinents del tall del zimogen i, conjuntament, formaran el lloc actiu de l'enzim. Cada tetràmer presentarà, doncs, dos centres actius. Les procaspases poden ser classificades en dos grans grups en funció de la longitud del seu prodomini situat a l'extrem N-terminal: les caspases amb un llarg prodomini serien les caspases iniciadores i les que presenten un prodomini curt, les efectores. Aquesta nomenclatura era coherent ja que les caspases amb un prodomini llarg, disposaven d'un domini d'interacció amb proteïnes adaptadores, a través de les quals es transmetria el senyal iniciador de la cascada apoptòtica. Les caspases amb un prodomini curt no podrien interaccionar amb proteïnes adaptadores i haurien d'ésser activades pel tall d'altres caspases.

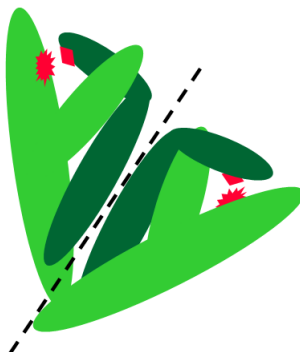


Figura 3.2. Tetràmer de caspases. En alguns casos, les caspases ha d'ésser activades a través de la formació d'un tetràmer originat per l'homodimerització del complex constituït per una subunitat gran i una de petita, provinents del tall de la procaspasa. En vermell s'observa el centre actiu de la caspasa.

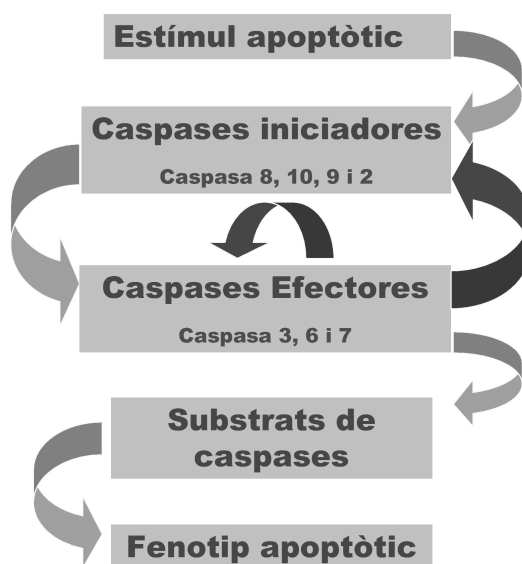


Figura 3.3. Cascada de caspases. Les caspases s'activen en forma de cascada. L'estímul apoptòtic induïx l'activació de les caspases iniciadores. Aquestes induïxen el tall de les caspases efectores. Aquestes últimes són les encarregades del tall dels substrats, que és el responsable de l'aparició del fenotip apoptòtic.

Les caspases efectores indueixen la major part dels canvis morfològics durant la mort apoptòtica ja que proteolitzen les dianes cel·lulars responsables d'aquests canvis. Fins ara, el llistat més exhaustiu d'aquestes dianes que coneixem és el de Fischer et al.(2003). A continuació, presentem una simplificació d'aquest llistat.

Taula 3.2. Substrats de caspases segons Fischer et al. (2003)

Substrat	Funció Fisiològica	Efecte de la proteòlisi
1.Reguladors d'apoptosi		
Apaf-1	Component d'apoptosoma	Inactivació?
Bad	Proteïna pro-apoptòtica de la família de Bcl-2	Activació
Bax	Proteïna pro-apoptòtica de la família de Bcl-2	Desconegut
Bcl-2	Proteïna anti-apoptòtica	Inactivació
Bcl-x _L	Proteïna anti-apoptòtica	Inactivació
Bid	Activador de l'apoptosi	Activació
c-FLIP	Inhibidor de la caspasa 8	
c-IAP1	Inhibidor de caspases	Inactivació
Procaspases	Procaspases 1 a 14	Activació
XIAP	Inhibidor de caspases	Inactivació?
2. Adhesió cel·lular		
β -Catenina	Adhesió cel·lular i senyalització a través de la via WNT/wingless, constituent de les unions adherents	Inactivació
3. Proteïnes estructurals i del citoesquelet		
α -Actina	Actina cardíaca, proteïna dels miofilaments	Inactivació
β -Actina	Citoesquelet	Inactivació
Fodrina	Component de la membrana cortical del citoesquelet (sinònim de α II espectrina)	Inactivació
Gelsolina	Proteïna que interacciona amb l'actina	Inactivació
Tau	Proteïna neuronal associada als microtúbuls	Inactivació
α -Tubulina	Components dels microtúbuls	Inactivació?

Vimentina	Filament intermedi específic de les cèl·lules mesenquèmials	Inactivació
-----------	---	-------------

4. Proteïnes estructurals del nucli

Làmina A	Proteïna de l'embolcall nuclear	Inactivació
Làmina B1	Proteïna de l'embolcall nuclear	Inactivació
Làmina C	Proteïna de l'embolcall nuclear	Inactivació

5. Proteïnes residents al Reticle Endoplasmàtic i al Golgi

6. Cicle cel·lular

Ciclina A	Ciclina A de <i>Xenopus</i>	Inactivació
Ciclina E	Regulador de la progressió cel·lular de G1 a S	Inactivació
MDM2/HDM2	Oncogèn que regula la degradació de p53	Inactivació
p21	Inhibidor de CDK2 implicat en la parada de G1 a S	Inactivació
p27	Inhibidor de CDK2	Inactivació
Rb	Proteïna Retinoblastoma, segresta en el seu estat hipofosforilat al factor de transcripció E2F-1	Inactivació
Wee1	Cinasa inhibidora de CDK1 i CDK2	Inactivació

7. Síntesi d'ADN, tall i reparació

ATM	Cinasa implicada en la via activadora de p53	Inactivació
ICAD	Inhibidor CAD (<i>Caspase-activated DNase</i>)	Inactivació
PARP-1	Implicada en la reparació de l'ADN i l'expressió de gens	Inactivació
PARP-2	Implicada en la reparació de l'ADN	Inactivació

8. Factors de transcripció i d'unió a l'ADN

Max	Factor de transcripció que s'uneix a Myc	Inactivació
STAT1	Transductor de senyal i activador de la transcripció 1	Inactivació

9. Síntesi de RNA i *splicing*

Nucleolina	Proteïna abundant, implicada en la transcripció del rRNA, la maduració dels ribosomes i el seu assemblatge	Desconegut
------------	--	------------

10. Traducció de proteïnes

eIF2 α	Factor d'iniciació de la traducció en eucariotes	Inactivació ?
---------------	--	---------------

11. Citocines

12. Receptors de membrana

EGF-R	Receptor del factor de creixement epidermal	Inactivació
TNF-R1	Receptor de la família dels del factor de necrosi tumoral	Inactivació

13. Proteïnes adaptadores

TRAF1	Factor 1 associat a TNF-R1	Inactivació
-------	----------------------------	-------------

14. Proteïna-cinases de Tirosina

15. Proteïna-cinases de Serina i Treonina implicades en la transducció de senyal

AKT	Cinasa implicada en la supervivència i que es coneix també pel nom de PKB	Inactivació
PAK2	Cinasa associada a p21	Activació
RIP-1	Component del DISC de TNF-R1	Inactivació

16. Fosfatases de proteïna

PP2A	Fosfatasa	Activació
------	-----------	-----------

17. Modificació de proteïnes

FTasa	Farnesil transferasa, s'encarrega d'unir farnesils als residus de Cisteïna de les proteïnes	Inactivació
-------	---	-------------

18. Degradació de proteïnes

19. Senyalització a través de proteïnes G

20. Metabolisme del Calci, de l'AMP-c, del GMP-c i dels lípids

21. Neurodegeneració

Huntingtina	Proteïna defectiva en la malaltia de Huntington	Aggregació
Parkina	Proteïna implicada en la malaltia de Parkinson	Inactivació
Presenilina-1	Proteïna implicada en l'Alzheimer	Inactivació
Presenilina-2	Proteïna implicada en l'Alzheimer	Inactivació

22. Proteïnes virals

CrmA	Inhibidor de caspases dels poxvirus	Activació
p35	Inhibidor de caspases d'ampli espectre provinent dels baculovirus	Activació

23. Altres substrats

Hsp90	Xaperona	Desconegut
-------	----------	------------

3.1.2 Les caspases iniciadores

No existeix un sol mecanisme d'activació per les caspases iniciadores. Estudis recents han demostrat que contràriament al que passa amb les caspases efectores, per algunes de les iniciadores, el processament del zimogen no és un requeriment necessari (per exemple, la CASP9). Els zimògens de les caspases iniciadores existeixen a l'interior de la cèl·lula com monòmers amb una certa activitat intrínseca. S'ha vist que en alguns casos, com podria ser el de la CASP8, l'oligomerització dels zimògens a través de les proteïnes adaptadores induirà el tall proteolític de la CASP8 en lo que s'ha anomenat, "model d'activació per proximitat" (Salvensen et Dixit, 1999). D'altra banda, l'activació de la CASP9 semblaria ser independent del tall enzimàtic però dependent també d'una multimerització en un complex holoenzimàtic.

Treballs recents han desvelat el mecanisme d'activació de la CASP8 (Chang et al, 2003). Els autors mostren com el zimogen de CASP8 s'activa en ésser reclutat a nivell del DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Llavors el zimogen és tallat entre la subunitat petita i la gran de la procaspasa 8. Aquest tall induïx un canvi conformacional que fa que s'exposi el lloc de tall entre la subunitat gran i el prodomini

de la procaspasa. El tall en aquest punt induirà l'activació de la CASP8. Sorprenentment la caspasa activa experimentarà un canvi d'especificitat de substrat respecte el zimogen. El dímer de la proforma reconeix el lloc de tall dins de la CASP8 mentre que la CASP8 madura reconeix amb poca afinitat el lloc de tall de la proforma i guanya afinitat per la CASP3.

El mecanisme d'activació de la CASP9 (veieu l'apartat 3.11) és diferent malgrat que també requereix la formació d'un complex multiproteïc, com en el cas del DISC i de la CASP8. La sortida de Cyt c del mitocondri desencadena la formació d'un complex multiproteïc anomenat apoptosoma al qual s'uneix el proenzim de la CASP9, el qual formarà un dímer amb un altre proenzim de CASP9. Aquest dímer presentarà només un centre catalític actiu i activarà la CASP3 (Jiang et Wang, 2004; Hill et al, 2003; Adams et al, 2002).

3.2 LA VIA EXTRÍNSECA VERSUS LA VIA INTRÍNSECA.

Les cèl·lules de mamífer tenen la capacitat d'engegar dues vies diferents d'apoptosi en funció del lloc d'inici de la cascada de caspases: la via extrínseca i la intrínseca. El terme "via extrínseca" es va encunyar per tal d'anomenar a aquelles apoptosis que s'iniciaven en els receptors de mort, i el de "via intrínseca" feia referència a les originades en el mitocondri. Malauradament, aquesta generalització ha fet que, per exemple, altres vies apoptòtiques iniciades en orgànuls diferents al mitocondri no se'ls anomeni via intrínseca.

Així convencionalment anomenem:

1. **Via intrínseca o mitocondrial** : aquella que s'inicia a través de la sortida de Cyt c del mitocondri i l'activació de la CASP9.
2. **Via extrínseca o dels receptors de mort** : aquella que s'inicia per la unió d'un lligam al seu receptor de mort (DR) corresponent i el subseqüent reclutament i activació de la Caspasa 8 (CASP8).

En les dues vies, la transducció del senyal apoptòtic es produeix per la formació de complexos multiproteïcs que afavoreixen l'activació de les caspases iniciadores. Finalment, les caspases iniciadores són les responsables de l'activació de les caspases efectores.

3.3 VIA EXTRÍNSECA.

La via extrínseca s'ha vist que participa en, per exemple, l'eliminació de les cèl·lules que estan en excés durant el desenvolupament, l'educació del sistema immune i la immunitat antitumoral. Aquesta via

s'inicia per la unió d'un lligam al seu receptor de mort corresponent, pertanyent a la superfamília del receptor tipus 1 del factor de necrosi tumoral (TNFR1). Fins al moment actual s'han identificat almenys 8 membres de la família dels DR a l'home: TNF-R1, Fas (Apo-1, CD95), DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (*ectodermal dysplasia receptor*) i p75^{NTR}.

Després de l'unió del lligam al DR, una sèrie de proteïnes són reclutades sota la membrana plasmàtica. Aquestes proteïnes permetran la fixació i activació de les caspases iniciadores, paradigmàticament la CASP8. Totes elles constituïran el DISC (*Death inducing signaling complex*). En algunes cèl·lules, la CASP8 activa proteolitza Bid (Li H et al., 1998, Luo X et al., 1998), una proteïna pro-apoptòtica de la família de Bcl-2. La forma truncada de Bid permeabilitza a través de Bax (i/o Bak) la membrana mitocondrial externa, permetent així la sortida de Cyt c i la formació de l'apoptosoma. En aquestes condicions, les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i/o Bcl-x_L són, a vegades, capaces d'inhibir la mort cel·lular iniciada per l'estimulació dels DRs, indicant un determinat model d'apoptosi per via extrínseca que requereix de la intervenció del mitocondri. Aquest model d'apoptosi per via extrínseca rep el nom de tipus II i és diferent del que no precisa del mitocondri per desencadenar l'apoptosi, que és anomenat de tipus I. Les evidències experimentals han assentat dues hipòtesis per explicar les bases moleculars de la via extrínseca de tipus II. La primera d'elles és que en els models que presenten una via extrínseca de tipus II, l'activació de la CASP8 no seria suficientment intensa per processar eficientment les caspases efectores, i per tant, requeriria del llaç d'amplificació del mitocondri realitzat per la proteïna Bid. La segona, situa aquesta via en models cel·lulars on les proteïnes IAPs estarien inhibint l'activació de les caspases. La inserció de la forma proteolitzada de Bid a la membrana, precediria la permeabilització de l'òrganul i la sortida de les proteïnes mitocondrials, entre elles de Smac/DIABLO. Aquesta proteïna contrarestaria els efectes dels IAPs frenant l'activació de les caspases (Sun et al., 2002). L'esmentat anteriorment permet que operativament poguem distingir via intrínseca de via extrínseca, i via extrínseca de tipus I de la de tipus II mitjançant compostos paninhibidors de caspases i la sobrefunció de Bcl-2 o Bcl-x_L. Aquesta aproximació s'ha seguit en els nostres treballs i s'esquematitza a la figura 3.4.

3.3.1 Les CASPS 8 i 10

Les caspases 8 i 10 es troben estretament relacionades; estan situades a la mateixa regió cromosomal, 2q33, i probablement s'han originat per un procés de duplicació gènica. És àmpliament acceptat que una de les característiques de les cèl·lules tumorals és que presenten mecanismes d'evasió de l'apoptosi (Hanahan et Weinberg, 2000). S'ha descrit que en alguns tumors aquest mecanisme passa per la hipermetilació del gen de la CASP8 i la subseqüent manca d'expressió d'aquesta caspasa. En les SH-SY5Y, una línia tumoral derivada d'un neuroblastoma, l'expressió de la CASP8 i de la CASP10 és regulada

		Pan-inhibidor de caspases	Bcl-2 o Bcl-X _L
VIA EXTRÍNSECA	Tipus I	+	-
	Tipus II	+	+
VIA INTRÍNSECA		-	+

Figura 3.4. Aproximació experimental per a distingir les vies apoptòtiques canòniques. Els efectes sobre la viabilitat cel·lular de la sobreexpressió de proteïnes de la família de Bcl-2 i la inhibició inespecífica de les caspases són determinats experimentalment. El signe positiu indica supervivència en front de l'estímul inductor de mort i el signe negatiu indica mort cel·lular. La combinatòria dels resultats obtinguts determina el tipus de via apoptòtica probablement implicada.

negativament a través de la hipermetilació d'aquests gens (Teitz et al, 2001; Teitz et al, 2000; Eggert et al, 2001). A més a més, aquestes caspases presenten un mecanisme post-traduccionals de control de l'activació als DRs a través dels gens de la família de c-FLIP. Els gens d'aquesta família també són anomenats FLIPs (*FLICE-like inhibitory proteins*). Els FLIPs presenten una estructura similar a la de la CASP8 (Muzio et al, 1996), i d'aquí que el seu nom provingui de la paraula FLICE, que és un vell acrònim per la CASP8. El gen c-FLIP es troba en un *cluster* de 200 Kb en el cromosoma 2q33-34, juntament amb la CASP8 i la 10, fet que suggereix que aquest gen també ha aparegut per duplicació d'un precursor comú (Krueger et al, 2001). El primer membre de la família de FLIP en ser identificat era d'origen viral. Era expressat pels virus γ -herpes i era capaç de bloquejar la mort iniciada en els receptors de mort associant-se al DISC (Bertin et al, 1997; Hu et al, 1997). Més tard, i gràcies a la comparació de seqüències en les bases de dades, es va identificar c-FLIP, l'homòleg cel·lular de v-FLIP. S'ha observat l'existència de diferents

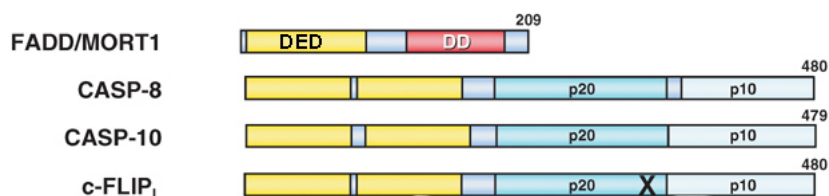


Figura 3.5. Comparació de les estructures de c-FLIP, FADD, les CASP8 i 10. c-FLIP presenta una estructura molt semblant a la de les CASP8 i 10 però sense un centre catalític actiu.

formes de *splicing* de c-FLIP, però només dues, c-FLIP_S i c-FLIP_L, han estat identificades a nivell de proteïna (Krueger et al, 2001). La forma curta de c-FLIP conté només dos dominis DED en tàndem i és molt semblant a v-FLIP. Aquesta forma semblaria tenir només una activitat antiapoptòtica similar a la de v-FLIP (Barnhart et al, 2003). La forma llarga de c-FLIP conté aquests dos dominis DED i un domini *protease-like*, homòleg al de la CASP8, però sense la cisteïna del domini catalític, per la qual cosa no presenta la funció proteolítica. Les dues formes cel·lulars de FLIP són reclutades a nivell del DISC de Fas on es creu que heterodimeritzen amb la CASP8 (Scaffidi et al, 1999). Paradoxalment, les observacions realitzades en MEFs de ratolins deficientes en c-FLIP indiquen que aquests són més resistents que els salvatges a la mort induïda per FAS. Aquests ratolins moren durant el desenvolupament fetal amb un fenotip molt semblant als deficientes en CASP8 o FADD (Varfolomeev et al, 1998; Yeh et al, 1998). És més, s'ha observat que la sobreexpressió transitòria de c-FLIP_L tant pot induïr com frenar l'apoptosi, i que la funció pro-apoptòtica de la forma llarga de FLIP precisa del domini *protease-like* (Goltsev et al, 1997; Han et al, 1997; Inohara et al, 1997; Shu et al, 1997). Krueger et al. (2001) publiquen una revisió sobre els FLIPs on proposen el presumpte mecanisme anti-apoptòtic de c-FLIP_L. Les evidències suggereixen que c-FLIP_L i la CASP8 són reclutats al DISC però que la presència de c-FLIP_L impedeix la proteòlisi total de la CASP8 necessària per l'activació de la cascada apoptòtica. Boatright i els seus col·legues han

realitzat estudis enzimàtics amb l'heterodímer CASP8/ c-FLIP_L. Conclouen que la formació d'aquest heterodímer està prioritzada respecte a la del homodímer de CASP8. Aquestes observacions concorden amb les publicacions de Micheau et al. (2002). Aquest grup mostra que a pesar d'un baix nivell d'expressió de c-FLIP_L a nivell del citosol, les concentracions d'aquesta proteïna són molt més altes a nivell del DISC. Boatright et al.(2004) evidencien que les propietats enzimàtiques del homodímer i de l'heterodímer són semblants però no idèntiques, ja que difereixen en la preferència per l'aminoàcid en posició 4 abans de l'aspàrtic del lloc de tall. Aquest grup i d'altres, han evidenciat que c-FLIP_L és un activador eficient de la CASP8 i 10 i que aquestes no han d'ésser completament processades per ser actives (Peter, 2004). Addicionalment, Boatright i els seus col·legues han demostrat que no existeix una diferència en l'especificitat del substrat de l'heterodímer CASP8/c-FLIP_L, sinó que és la localització diferencial de la CASP8 sota forma d'homodímer respecte la d'heterodímer la que determina la seua funció. L'esquema resum d'aquestes darreres publicacions es troba il·lustrat a la figura 3.6. Com es pot observar, aquest model intenta explicar la implicació de la la CASP8 en la proliferació i la progressió en el cicle cel·lular, especialment de les cèl·lules limfoides.

La bibliografia descriu l'existència d'una associació tant de CASP8 com de CASP10 al DISC de FAS, encara que és la CASP8 la que s'ha trobat més freqüentment involucrada en la inducció de l'apoptosi per aquesta via (Barnhart et al, 2003) . La CASP10 és un ortòleg de CASP8 que conté, al igual que aquesta, dos dominis DED (*Death effector domain*) en tàndem. La CASP10 no té un ortòleg funcional en ratolí, fet que ha dificultat l'estudi d'aquesta caspasa (Peter et Krammer, 2003). La bibliografia aporta evidències contradictòries sobre la possibilitat de que CASP10 sigui capaç de suplir CASP8 en la inducció d'apoptosi en la via extrínseca de receptors de mort. Alguns grups postulen que la CASP10 i la CASP8 tenen papers redundants com iniciadores de l'apoptosi via Fas o TRAIL (Wang et al, 2001c; Kischkel et al, 2001), mentre que d'altres grups, com el de Sprick et al. (2002), critiquen aquests resultats perquè consideren que els nivells d'expressió de CASP10 en els anteriors sistemes era superior al fisiològic. En els seus experiments la CASP10 no supleix la funció de la CASP8 quan les cèl·lules són estimulades amb el lligam de Fas o TRAIL. Aquest mateix grup suggereix que en base als seus resultats, la CASP10 tindria una funció diferent a la de la CASP8 en la inducció d'apoptosi. És més, suggereixen que la CASP10 podria estar implicada en una via no apoptòtica, o bé, simplement actuaria diversificant el senyal que s'inicia en Fas o TRAIL (Sprick et al, 2002).

Alternativament, s'ha observat que tant la mutació del gen de la CASP8 com el de la CASP10 són el desordre molecular que es troba darrera de diferents síndromes limfoproliferatives autoimmunes -ALPS en anglès- (Puck et Straus, 2004). Aquestes síndromes es caracteritzen per la presència en sang perifèrica d'una gran quantitat de limfòcits T doble negatiu (CD4^{-/-} CD8^{-/-}) que han escapat a l'apoptosi via

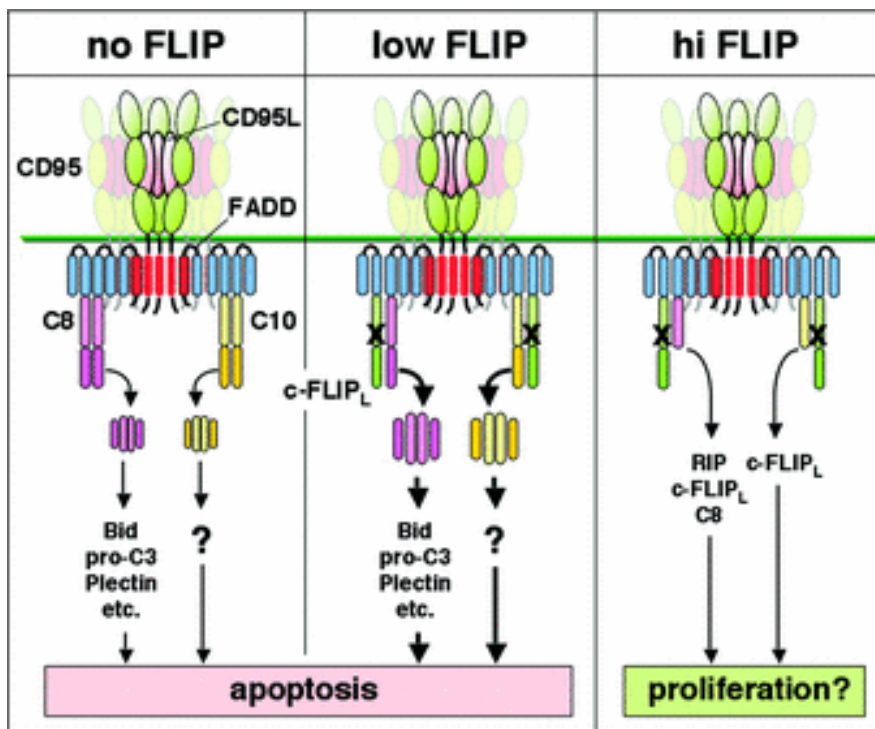


Figura 3.6. Model de les diferents funcions de c-FLIP_L en funció dels seus nivells d'expressió. La figura representa les diferents possibilitats pel DISC de Fas en funció de les concentracions de c-FLIP_L. Quan no hi ha c-FLIP_L, la proCASP8 i la 10 són reclutades a nivell de DISC mitjançant la molècula adaptadora FADD. Com a conseqüència, es produeix el processament i l'activació de les caspases iniciadores. Aquesta activació es produeix per homodimerització del enzims. A continuació els enzims actius, en forma d'estructures tetramèriques, són alliberats del DISC i s'inicia la cascada proteolítica que desencadenarà l'aparició del fenotip apoptòtic. Quan els nivells de c-FLIP_L són baixos, l'activació de les CASP8 i 10 s'accelera a través de l'augment en l'eficiència de formació d'heterodímers entre les caspases i c-FLIP_L. A *posteriori*, es produeixen els esdeveniments prèviament citats en absència de c-FLIP_L i que desencadenaran en l'aparició del fenotip apoptòtic. Quan els nivells de c-FLIP_L són alts, les CASP8 i 10 s'activen, però no són alliberades del DISC. Aquestes CASPs segrestades al DISC continuen tenint la mateixa especificitat de tall que en les anteriors situacions. Tanmateix, les restriccions en la localització faran que les caspases tallin un grup de substrats diferents, per exemple, les pròpies CASP8 i 10, RIP i c-FLIP_L. A nivell biològic, es pensa que aquesta darrera situació seria important en el control de processos independents de l'apoptosi com, per exemple, la proliferació. El lloc inactiu en el domini *protease-like* de c-FLIP_L és representat per una X (Peter, 2004).

FAS. Aquesta coincidència semblaria suggerir la importància de cadascuna de les dues caspases en el desencadenament de la mort apoptòtica des dels receptors de mort de membrana.

3.3.2 La CASP2

La CASP2 té un prodomini llarg com les altres caspases iniciadores encara que la seua especificitat de tall és més propera a les caspases efectores. Aquesta caspasa s'ha implicat en la toxicitat per la proteïna β -amiloide i la privació de factors tròfics. La CASP2 és la més conservada evolutivament i es troba de forma constitutiva al nucli (Paroni et al., 2002). Existeixen 2 isoformes de CASP2 aparegudes per *splicing* alternatiu. Aquestes isoformes presenten diferents efectes sobre la mort apoptòtica: la CASP2_L que és la isoforma dominant expressada en la majoria de teixits (pro-apoptòtica) i la CASP2_S (antia-poptòtica). La CASP2 conté en el seu prodomini un domini de reclutament de caspases (CARD). Les caspases amb dominis CARD s'activen mitjançant la interacció amb proteïnes adaptadores que contenen aquest mateix domini. És més, s'ha descrit que la proteòlisi de la CASP2 no és en absolut necessària per la seua activació i, que ans al contrari, aquest tall podria resultar inactivador per l'enzim. L'activació de la CASP2 a nivell dels receptors de mort es produiria gràcies a la interacció amb CRADD/RAIDD (*Death domain/RIP-associated Ich-1 homologous protein*) a través dels dominis CARD d'ambdues proteïnes. En les primeres publicacions es mostrava que RAIDD podia interactuar amb RIP i després amb TNFR1 a través de TRADD, d'aquesta manera reclutaria la CASP2 a nivell d'aquest complex perquè es produís una mort dependent de TNFR1. Algunes publicacions, però, fiquen en dubte la importància de CASP2 i/o RAIDD en la mort iniciada en receptors de mort (DR). Aquest fet és així ja que s'ha vist que la sobre-expressió de RAIDD induïx la mort apoptòtica, mentre que el bloqueig de RAIDD o CASP2 mitjançant dominants negatius no impedeix la mort induïda per TNF (Troy et Shelanski, 2003).

3.4 LA VIA INTRÍNSECA

El mitocondri juga un paper tant en la vida com en la mort cel·lular. D'una banda proporciona energia en forma d'adenosina trifosfat (ATP) a més a més de mantenir l'homeòstasi cel·lular en relació tant als fluxos d'ions com a l'estrès oxidatiu. De l'altra banda es caracteritza per alliberar proteïnes implicades en l'activació del procés apoptòtic. A l'apoptosi s'esdevenen un seguit de canvis mitocondrials que provoquen la permeabilització de la membrana mitocondrial externa. Aquest fet comporta l'alliberament de proteïnes de l'espai intermembranari com Citocrom C (Cyt c), Smac/DIABLO, el factor inductor de l'apoptosi (AIF), l'endonucleasa G (Endo G) i Omi/HtrA2. Els membres de la família de Bcl-2 regulen la sortida de proteïnes de l'espai mitocondrial intermembranari. En el moment que Cyt c és alliberat,

participa en l'activació de caspases a través de l'ensamblament del complex de l'apoptosoma per reclutament d'Apaf-1 i de la pro-caspasa9; Smac/DIABLO agonitza els inhibidors de caspases (IAPs); i AIF i Endo G actuen causant danys a l'ADN.

Els knock-out d'Apaf-1, CASP9 i CASP3 presenten un fenotip comú caracteritzat per defectes en el desenvolupament dels sistema nerviós central (SNC) greus. Aquest resultat reflexa la importància de la via intrínseca durant el desenvolupament del cervell. A més a més, aquesta via està implicada en l'homeòstasi del sistema immune i l'eliminació de les cèl·lules danyades. D'altra banda, resulta essencial en la mort cel·lular per estrès o dany genotòxic, fet que la converteix en un element protector enfront del càncer. La via mitocondrial pot actuar també com un mecanisme d'amplificació de l'apoptosi iniciada en els receptors de mort i la mort induïda per granzima B (Jiang i Wang, 2004).

3.4.1 Els membres de la família de Bcl-2

La permeabilització de la membrana mitocondrial externa és regulada per proteïnes de la família de Bcl-2 (Gross et al., 1999; Vander Heiden et Thompson, 1999; Borner, 2003; Green et Evan, 2002; Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003). De les aproximadament 20 proteïnes conegudes de la família de Bcl-2, algunes estan associades constitutivament a les membranes intracel·lulars, especialment a les membranes del reticle endoplasmàtic (RE), de la membrana mitocondrial externa i del nucli. Altres membres d'aquesta família es troben de forma soluble al citoplasma, de manera que l'arribada d'un estímul apoptòtic induirà la seua translocació a la membrana mitocondrial externa.

Els membres de la família de Bcl-2 es caracteritzen per contenir en la seua seqüència aminoacídica almenys un domini d'homologia a Bcl-2 (*BH*). S'han classificat en dos grups segons la seua capacitat per inhibir o promoure l'apoptosi (veieu la figura 3.8). Dins del grup de les proteïnes pro-apoptòtiques s'han subclassificat segons si presenten múltiples dominis *BH* o només un domini *BH3*. Les proteïnes amb un sol domini *BH3*, també anomenades pel seu homònim anglès *BH3 only*, tenen una funció inductora d'apoptosi i requereixen la cooperació d'altres membres de la mateixa família amb múltiples dominis *BH* per induir la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (Wei MC et al., 2000, Lindsten T et al. 2000, Wei MC et al. 2001, Cheng EH et al., 2001) . Recentment s'ha constatat l'existència de diferències funcionals entre els diferents *BH3 only*. Sembla ser que, mentre que alguns poden actuar provocant directament la inserció de Bax o Bak a la membrana, altres podrien estar actuant indirectament mitjançant la inactivació dels membres anti-apoptòtics de la família com Bcl-2 o Bcl-xl.

Una hipòtesi atractiva per explicar la presència d'una gran diversitat de proteïnes *BH3 only* és que cada grup d'estímuls apoptòtics s'encarrega d'activar una proteïna *BH3 only* específica a través d'un

mecanisme determinat (Huang i Strasser, 2000). Per exemple, podríem classificar les proteïnes *BH3 only* en:

1. Sensors de proteòlisi. BID és una *BH3 only* que actua com un sensor de la proteòlisi citoplasmàtica. La seqüència aminoacídica de BID presenta llocs de tall per proteases tan diferents com la granzima B (Li et al, 1998), les catèpsines (Stoka et al, 2001), les calpaïnes (Chen et al, 2001) i la CASP8 (Li et al, 1998). En el cas de la CASP8, BID és fragmentat i es genera la proteïna tBID (*truncated Bid*), la qual cosa facilita la seua N-miristoilació a l'extrem carboxi-terminal (Zha et al, 2000) i la translocació mitocondrial (veieu la figura 3.7).

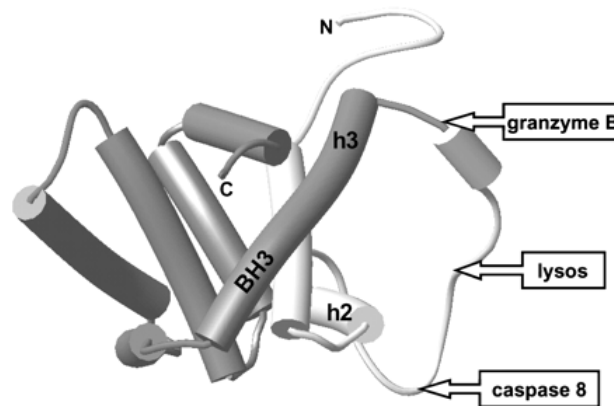


Figura 3.7. Llocs de tall de Bid (Stoka et al, 2001). Bid pot ser proteolitzat per diversos enzims proteolítics, per exemple, la caspasa 8, els enzims lisosomals i la granzima B.

2. Sensors de dany al citoesquelet. Bim, és una altra *BH3 only* implicada en l'apoptosi induïda per rajos ultraviolats (UV) i diferents tipus de mort timocitària (Bouillet et al, 1999), per exemple, la dels timòcits autoreactius (Bouillet et al, 2002). També s'ha involucrat en la mort de neurones privades del factor de creixement neuronal o NGF (Putcha et al, 2001). Puthalakath et al. (1999) van descriure que la proteïna Bmf en cèl·lules sanes està segrestada al complex motor de la miosina V a través d'associar-se a la cadena lleugera 2 de la dineïna. Aquesta *BH3 only* s'allibera en resposta a la pèrdua de contacte amb les cèl·lules veïnes, és a dir, el fenomen d'*anoikis*, un terme importat del grec i que significa sense casa. Un cop lliure, Bmf canvia la seua localització i és capaç d'unir-se a les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2.
3. Sensors del dany via p53. En general totes les anteriors proteïnes *BH3 only* són regulades a nivell post-transcripcional però també existirien algunes d'aquestes proteïnes que serien activades transcripcionalment. Aquest és el cas de Noxa (Oda E et al., 2000) i Puma (Nakano K and Vousden KH, 2001, Yu J et al., 2001), l'expressió dels quals és regulada per l'activació de p53.

Les proteïnes de la família de Bcl-2 s'assemblen estructuralment a la toxina diftèrica i, com aquesta,

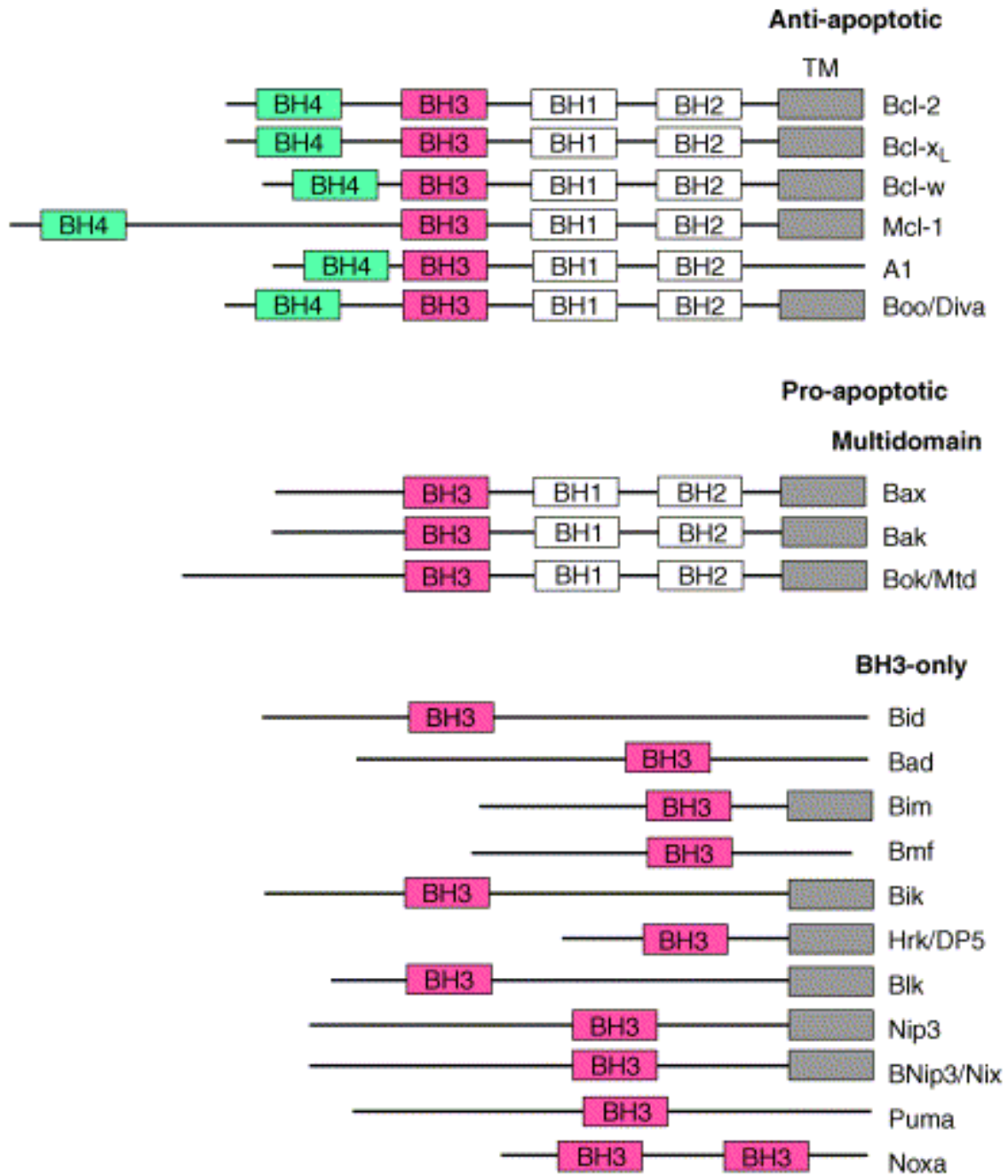


Figura 3.8. La família de Bcl-2. "TM" es refereix a la regió hidrofòbica en l'extrem carboxi-terminal d'algunes d'aquestes proteïnes i que inicialment es creia que era un domini transmembrana. No està clar si aquestes regions facilitarien d'alguna manera l'associació a la membrana en tots els casos. (Kuwana i Newmeyer, 2003).

poden formar canals en determinades condicions. Per aquest motiu, inicialment, es va intentar explicar l'activitat pro-apoptòtica d'alguns membres de la família mitjançant la formació d'un canal. Posteriorment s'ha vist que el fenomen de permeabilització de la membrana mitocondrial externa és quelcom de més complex. D'altra banda, la família de Bcl-2 pot regular també la integritat del reticle endoplasmàtic i, a través d'aquesta regulació, incidir en l'apoptosi (Scorrano et al, 2003; Zong et al, 2003). Marsden et al. (2002) van proposar un nou model per explicar l'activitat anti-apoptòtica de Bcl-2. Aquest grup va suggerir que Bcl-2 podria funcionar inhibint una caspasa iniciadora capaç d'induir directament la sortida de Cyt c del mitocondri. Aquesta idea estava sustentada en el paper de Bcl-2 a *C. elegans*. En aquest cas, CED-9 (l'homòleg de Bcl-2) segrestava CED-4 (l'homòleg d'Apaf-1) i a través d'aquest fet, impedia que s'activés CED-3 (l'homòleg de la CASP3). Tanmateix, Marsden i els seus col·legues no van poder identificar la caspasa iniciadora ni la proteïna que funcionaria com CED-4, encara que sí van veure que no es tractava d'Apaf-1. En aquest sentit, Lassus et al.(2002) van demostrar que en fibroblasts humans transformats amb l'oncogen adenoviral E1A, l'estrès citotòxic induïa l'activació de la CASP2 en un pas previ a la permeabilització mitocondrial i a la sortida del Cyt c. Finalment, s'ha descrit que, en alguns models, la cooperació dels membres pro-apoptòtics de la família de Bcl-2 i certs lípids, generaven una corbatura específica a la membrana que era necessària per a la permeabilització mitocondrial (Green i Kroemer, 2004).

3.4.2 La permeabilització del mitocondri

S'han proposat dos mecanismes de permeabilització de la membrana mitocondrial externa (veieu la figura 3.9):

1. El primer d'ells participa tant a la mort necròtica com a l'apoptòtica i implica l'obertura del porus de transició mitocondrial (PT), en resposta a, per exemple, l'alliberament de calci des de les reserves del RE. Les proteïnes de la família de Bcl-2 juguen un paper important en aquesta via gràcies a la seua localització en la membrana de RE. L'obertura del porus de transició mitocondrial comporta l'expansió de la matriu i, seguidament, es produeix la ruptura de la membrana mitocondrial externa i l'alliberament de citocrom c, Cyt c. En alguns casos, per exemple, en el dany per isquèmia-reperfusió o la resposta a alguns estímuls citotòxics que provoquen la sobrecàrrega mitocondrial de calci, s'ha observat una obertura transitòria del porus en només una fracció de la població mitocondrial. A continuació, es produiria l'alliberament de proteïnes mitocondrials sense que fos necessari, ni l'inflament de la matriu, ni una caiguda del potencial mitocondrial (Gogvadze et al., 2001).

2. El segon mecanisme de permeabilització implica directament les proteïnes pro-apoptòtiques de la família de Bcl-2. Aquest mecanisme precisa de l'actuació conjunta de les proteïnes anomenades *BH3 only* (Bid, Bim) i de les *BH1-3* (principalment Bax i Bak). De fet, els MEFs doble *knock-out* Bax/Bak són resistent a la mort per la major part de estímuls citotòxics a pesar de disposar de les proteïnes *BH3 only* (Wei MC et al., 2001). Especial interès mereix el fet que les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X_L actuïn, en part, segrestant les *BH3 only* en complexes estables i impedit l'activació de Bax i Bak (veieu la figura 3.9).

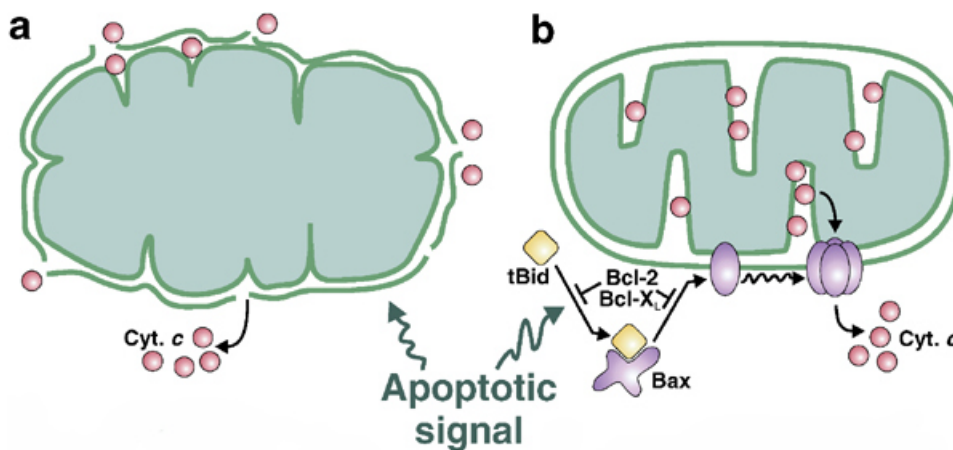


Figura 3.9. Mecanismes de permeabilització de la membrana mitocondrial externa (OMM) i alliberament del citocrom c. (a) La inducció de la permeabilització de la membrana (PT) a través de l'obertura del porus PT, l'expansió de la matriu mitocondrial i la ruptura de la OMM. (b) La permeabilització de OMM a través de la inserció de Bax a la OMM via tBid, seguidament es produeix l'homooligomerització de Bax que pot ser frenada per Bcl-2 o Bcl-X_L (Robertson et al, 2003).

Com ja hem esmentat anteriorment, la permeabilització de la membrana mitocondrial (MMP) és un procés altament regulat per les proteïnes de la família de Bcl-2. Les proteïnes anti-apoptòtiques com Bcl-2, Bcl-X_L i Mcl-1 la inhibeixen mentre que Bax, Bak i les proteïnes *BH3 only* l'estimulen. Diverses publicacions mostren que moltes senyals d'estrès desencadenen apoptosi gràcies a l'activació de les proteïnes *BH3 only*. Aquestes proteïnes poden induir la MMP per dos vies: la primera consisteix en l'activació directa de Bax/Bak (per exemple Bid o Bim), i la segona es basa en la inhibició de l'activitat anti-apoptòtica de Bcl-2/ Bcl-X_L (per exemple Bad, Bik).

Bax és un dels inductors clau de la MMP. Aquesta proteïna és essencialment citosòlica en una conformació tal que les α -hèlix 5, 6 i l'hèlix 1 amino-terminal estan amagades en una estructura globular hidrofòbica. Quan apareix una senyal apoptòtica, per exemple la generació de la forma truncada de Bid (t-Bid), Bax experimenta un canvi de conformació que fa que s'exposi el seu extrem amino-terminal i, possiblement, el seu domini *BH3*. Aquest fet causa la seua translocació al mitocondri i la formació d'homooligòmers o heterooligòmers amb Bak a la membrana externa. El mecanisme precís d'associació de Bax a la membrana mitocondrial externa durant l'apoptosi no està clar, només es sap que

acabarà desencadenant la MMP. Recentment, en experiments amb cèl·lules expressores de v-MIA (*viral Mitochondria-localized Inhibitor of Apoptosis*) sotmeses a estímuls apoptòtics s'ha evidenciat que la integració i oligomerització de Bax a la membrana mitocondrial externa no és un esdeveniment suficient en si mateix per induir la MMP (Poncet et al., 2004).

3.4.3 Apoptosoma

Com ja hem esmentat, l'activació de les caspases iniciadores requereix d'una estructura proteica de suport. En el cas de la CASP9 s'anomena apoptosoma. L'apoptosoma s'organitza en resposta als senyals que provoquen la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i l'alliberament de Cyt c al citosol.

Històricament, va ser el grup de Xiadong Wang qui va identificar l'apoptosoma. En aquells moments s'estava emprant els sistemes *cell free* per estudiar l'apoptosi, és a dir, nuclis cel·lulars s'exposaven a extractes citoplasmàtics de cèl·lules induïdes a morir apoptòticament. La innovació de Wang va consistir en la utilització d'extractes de cèl·lules sanes que, curiosament, seguien induint apoptosi a nuclis de les cèl·lules sanes (Liu et al., 1996). Posteriorment, es van purificar bioquímicament les diferents fraccions amb activitat pro-apoptòtica i a partir d'aquí es van identificar els diferents components de l'apoptosoma. A les proteïnes així identificades, les va anomenar *apoptosis activating factor* (Apaf) i els va assignar un numero:

1. Apaf-1, que va resultar ser una proteïna desconeguda i s'ha continuat anomenant així.
2. Apaf-2, que sorprenentment va resultar ser Cyt c.
3. Apaf-3, que va resultar ser la CASP9.
4. ATP o dATP, que era un factor no proteic requerit per a l'apoptosi. Curiosament, es va detectar que el dATP superava en 3 ordres de magnitud a l'ATP en la potència inductora.

3.4.3.1 APAF-1

Apaf-1 és una proteïna amb 3 dominis funcionals ben diferenciats (veieu la figura 3.10):

- a. Un extrem amino-terminal amb un domini CARD (*caspase-recruitment domain*). El zimogen de CASP9 conté també un domini CARD.
- b. Un domini central de reclutament de nucleòtids (NBD) que unirà el ATP o el dATP sense que sigui necessària la hidròlisi.

- c. Un llarg extrem carboxil amb 12 a 13 repeticions del motiu “WD-40”, que sovint media l’associació proteïna-proteïna. Aquesta regió està regulant negativament Apaf-1, ja que la seua eliminació genera una forma constitutivament activa (Srinivasula et al, 1998; Hu et al, 1998). Durant l’apoptosi, el Cyt c alliberat interactua amb aquesta regió i facilita la formació de l’apoptosoma.

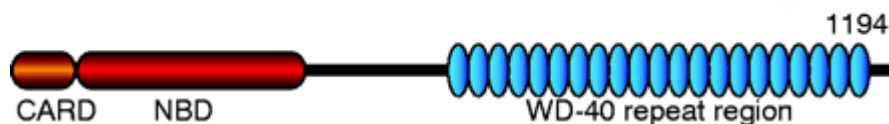


Figura 3.10. Dominis en l’estructura de Apaf-1. En l’imatge es troben representats el domini de reclutament de les CASPs (CARD), el domini d’unió de nucleòtids (NBD) i la regió amb repeticions “WD-40”.

Com ja comentarem més extensament a l’apartat 6.1, Apaf-1 és una diana transcripcional de p53 i E2F. Apaf-1 i CASP9 estarien actuant, per tant, en alguns casos com mitjancers de l’acció pro-apoptòtica de p53 (Adams i Cory, 2002).

La forma inactiva d’Apaf-1 sembla ser un monòmer globular en el qual el domini CARD i probablement part de NBD estan amagats entre les repeticions “WD-40”. El Cyt c alliberat del mitocondri s’unirà a la regió amb repeticions “WD-40” i induirà que Apaf-1 passi d’una conformació rígida a una de més flexible. Aquest fet facilita la unió dels nucleòtids (dATP o ATP) al domini NBD, fet que desencadenarà l’oligomerització de la proteïna.

Akey i els seus col·laboradors van descriure l’estructura de l’apoptosoma combinant el resultat de les seues pròpies observacions per criomicroscopia electrònica a una resolució de 27 Å i publicacions prèvies sobre el tema (Acehan et al, 2002). L’apoptosoma està format per 7 molècules d’Apaf-1 que configuren una estructura d’estrella ninja de 7 puntes. A cada punta de la estrella trobem la regió amb les repeticions de “WD-40” on s’ha unit el Cyt c. El centre de l’estrella conté els dominis CARD que permeten la interacció entre les diferents molècules d’Apaf-1 al zimògen de CASP9. És molt probable que aquesta interacció indueixi el desplegament total de la CASP9, conformació amb una màxima activitat que no podria ser adquirida pel simple processament proteolític (Jiang i Wang, 2004). A més, els estudis cristal·logràfics suggereixen que només un dels centres catalítics del dímer de proCASP9 és actiu (Renatus et al, 2001). En resum, la maquinària de l’apoptosoma és un mecanisme d’activació per les caspases, en concret de la CASP9. És remarcable que, d’una banda, es requereix d’una constant associació de l’enzim al complex apoptosomal i, d’altra banda, el tall proteolític de la CASP no és necessari per la seua activitat (Srinivasula et al, 2001). Respecte aquesta darrera afirmació, volem destacar que existeix discrepància entre diferents grups i algunes publicacions parlen que l’activació de la CASP9 en l’apop-

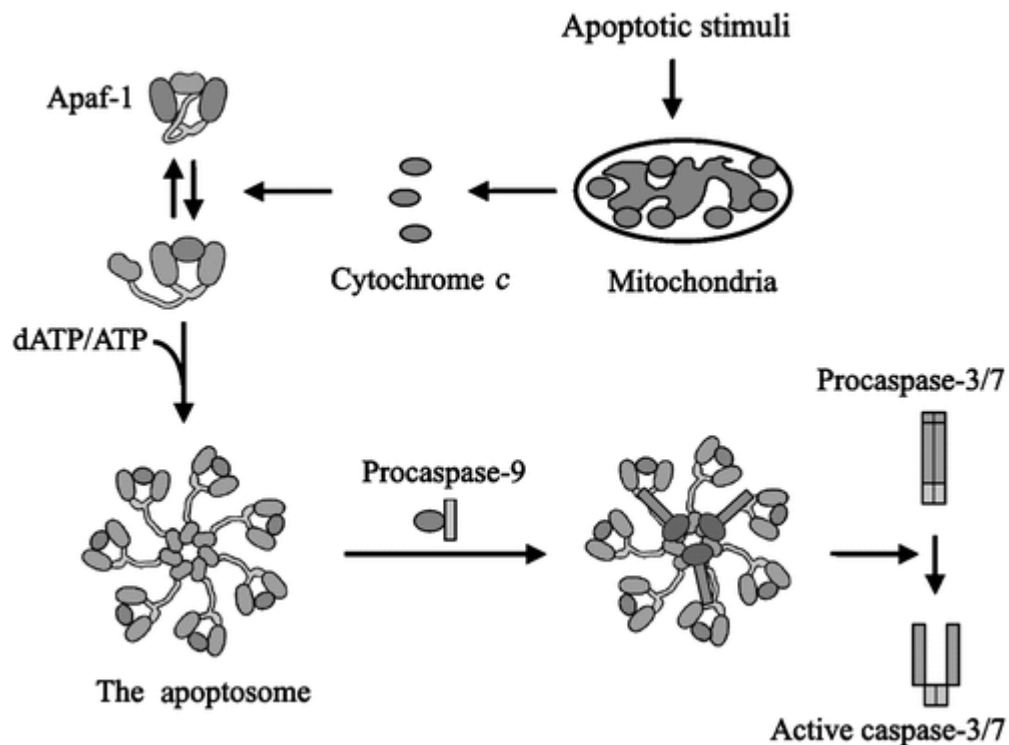


Figura 3.11. Formació de l'apoptosoma i activació de les CASPs després de la sortida del Cyt c (Jiang i Wang, 2004).

tosoma requereix de l'estructuració en forma tetramèrica que trobem a les caspases quan es processen proteolíticament (Shiozaki et al, 2003).

S'han trobat en cèl·lules apoptòtiques i en models "in vitro" dos formes de l'apoptosoma amb diferent pes molecular: una forma activa de ~700 kDa i una forma inactiva de ~1400 MDa. El significat biològic d'aquesta darrera forma no està del tot clar, com tampoc el perquè és funcionalment inactiva (Hill et al, 2003).

Existeixen mecanismes capaços de frenar l'activació de l'apoptosoma un cop aquest ha estat assemblet, per exemple:

- La sobreexpressió en cèl·lules de XIAP, cIAP-1 o cIAP-2 interfereix amb l'activació normal de les CASP3, 7 i 9 després de la multimerització de l'apoptosoma (Deveraux et al, 1998).
- Algunes *heat shock proteins* com la hsp70 o la hsp27 han estat implicades en la supressió de l'apoptosi per l'oligomerització de l'apoptosoma. S'ha descrit que hsp70 impedeix l'activació de les CASPs en la via mitocondrial a través de l'associació directa amb Apaf-1 i el bloqueig del reclutament de la proCASP9 (Beere et al, 2000; Saleh et al, 2000).

La interacció de XIAP amb les CASPs requereix que aquestes estiguin processades. L'autoproteòlisi de la CASP9 en la posició D315 genera un nou extrem amino-terminal amb una seqüència similar a la de

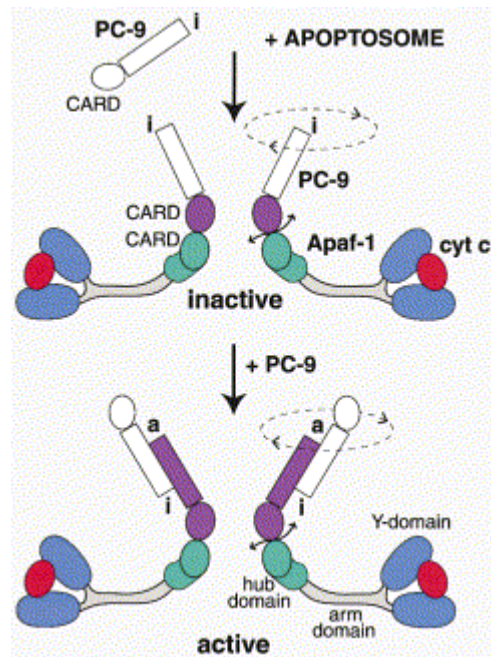


Figura 3.12. Model d'activació de la proCASP9 a l'apoptosoma. La proCASP9 en solució és un monòmer amb un centre catalític inactiu (representat a la figura per una "i"). En el primer pas de l'activació, la proCASP9 s'uneix a través del domini CARD al centre de l'estrella de set puntes que configura l'apoptosoma. En aquest punt, el monòmer de proCASP9 és mòbil (representat per cercles de fletxes) i inactiu. L'associació d'una segona proCASP9 a la primera originarà un dímer amb un sol centre actiu (representat per una "a"). Aquest centre actiu es trobaria en la proCASP9 que ja estava unida a Apaf-1 pel seu domini CARD (Acehan et al, 2002).

SMAC/DIABLO. Aquest nou extrem és necessari per la interacció de la CASP9 i XIAP (Srinivasula et al, 2001). En base a aquests treballs, seria lògic pensar que el sentit de l'autoproteòlisi de la CASP9, que no és requerit per la seua activació, seria el permetre la unió als IAPs per frenar la feble activació de la CASP9 en un context no desitjat. La CASP9 té a més un lloc de tall per la CASP3 a D330 (Srinivasula et al, 1996). Estudis cinètics realitzats amb la CASP9 processada en D330 i assemblada formant l'apoptosoma, mostraven que aquesta era unes 8 vegades més activa que la CASP9 no proteolitzable en D330. Aquestes darreres observacions suggerien l'existència d'un bucle de retroalimentació positiva entre la CASP3 i la CASP9 (Zou et al, 2003). El paper fisiològic d'aquests llocs de tall ha d'ésser més estudiat abans d'acceptar plenament les anteriors hipòtesis (Jiang i Wang, 2004).

3.4.3.2 Citocrom c

El Cyt c és una proteïna codificada en el genoma nuclear de la cèl·lula. És sintetitzada als ribosomes sota la forma d'apo-citocrom c. A l'interior del mitocondri serà activada gràcies a la conjugació d'un grup hemo per la "hemo liasa", la forma mitocondrial amb el grup hemo és l'holoproteïna. Només l'holocitocrom c és capaç, quan surt del mitocondri, d'induir el canvi de conformació d'Apaf-1 que precedeix a l'activació de la CASP9. El Cyt c es troba unit a la membrana mitocondrial interna a través de l'associa-

ció a un lípid aniònic anomenat cardiolipina (Nicholls P, 1974). La cardiolipina es troba exclusivament a nivell del mitocondri i, predominantment, a la membrana mitocondrial interna. Les evidències experimentals fan pensar que l'alliberament de Cyt c durant l'apoptosi és precedida per la pèrdua de la unió entre la cardiolipina i el Cyt c. És més, alguns estudis demostren que l'exposició de partícules submitocondrials als radicals oxidants (ROS) originats a conseqüència de la disrupció de la cadena de transport d'electrons, desencadena l'alliberament de Cyt c i la concomitant pèrdua de cardiolipina (Petrosillo et al, 2001). Paral·lelament, altres estudis demostren que la reducció del contingut mitocondrial en cardiolipina s'associa a la disminució de la respiració (Koshkin i Greenberg, 2000) i també a l'augment estequiòmetric del Cyt c alliberat (Ostrander et al, 2001). Les publicacions d'Ott i els seus col·legues (2002) demostren que la simple permeabilització de membrana mitocondrial externa amb Bax és insuficient per alliberar el Cyt c i que, prèviament, es precisa la peroxidació de la cardiolipina (veieu la figura 3.13). En resum, tots aquests treballs demostren que la cardiolipina juga un paper important a:

- l'estructura i funció de la cadena respiratòria
- el manteniment del Cyt c a l'espai intermembrana (Robertson et al., 2003).

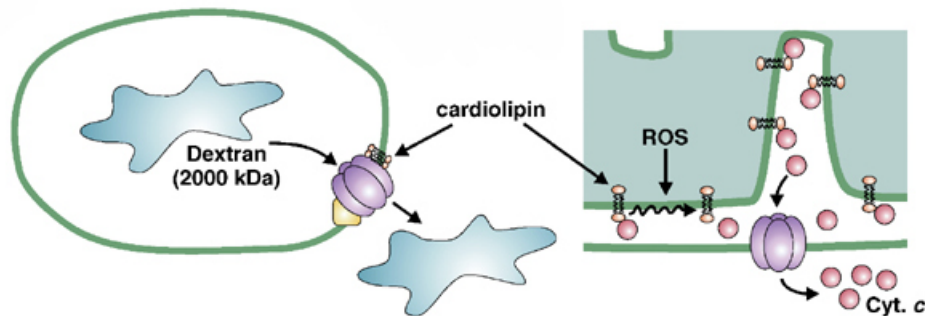


Figura 3.13. Mecanismes de permeabilització de la membrana amb intervenció de la cardiolipina (Robertson et al., 2003). (a) Permeabilització de la membrana mitocondrial externa induïda per la interacció entre tBid, Bax i la cardiolipina que formarien obertures capaces de permetre el pas de grans molècules de dextrans. (b) La peroxidació de la cardiolipina és el pas previ a la mobilització del Cyt c des de la membrana mitocondrial interna, abans de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa induïda per Bax.

Kuwana i els seus col·legues van demostrar que la formació de porus amb mesclades de tBid i Bax monomèric requeria cardiolipina. Els porus formats tenien un tamany suficient per permetre la sortida de molècules de dextrans compreses entre 10 i 2000 kDa sense que l'ultraestructura de la membrana es veiés afectada (veieu la figura 3.13).

Anteriorment, s'havia proposat que la proteïna VDAC (*voltage-dependent anion channel*), un dels components del porus de transició mitocondrial, era necessària per la sortida de Cyt c dependent de Bax (Shimizu et al, 1999). Roucou i els seus col·legues van testar si Bax induïa la sortida de Cyt c d'igual

III – INTRODUCCIÓ

forma en mitocondris de llevat amb i sense VDAC. En aquest sistema, la sortida de Cyt c induïda per Bax, era independent de la presència d'aquesta proteïna.

Altres proteïnes han aparegut en el panorama de l'apoptosi per via mitocondrial. Entre elles es troba Drp1, una proteïna associada a la dinamina que habitualment media la fissió mitocondrial. Frank et al. (2001) van examinar el paper d'aquesta proteïna en l'apoptosi. Drp1 es relocalitza des del citoplasma al mitocondri durant l'apoptosi. Quan s'indueix mort per sobreexpressió de Bax, l'expressió d'un mutant de Drp1, prevé amb efectivitat la fragmentació mitocondrial, la pèrdua de potencial i l'alliberament de Cyt c però aquesta sobreexpressió es mostra inefectiva per prevenir la inserció de Bax a la membrana mitocondrial. És més, el mutant de Drp1 protegeix de l'apoptosi induïda amb Fas-L o etopòxid. En conclusió, tots aquests resultats indiquen que Drp1 és un modulador essencial de la permeabilització mitocondrial i d'alguns dels canvis que experimenta el mitocondri durant l'apoptosi. Aquests resultats fan preveure l'aparició de noves proteïnes moduladores, possiblement de la família de Drp1, implicades en la morfologia, remodelació i permeabilització mitocondrial (Robertson et al, 2003).

Recentment s'ha descrit la presència al mitocondri de diverses proteïnes amb un motiu d'unió al domini BIR dels IAPs (IBM). Aquestes proteïnes solen ser sintetitzades com proteïnes precursors amb un pèptid senyal de localització a mitocondri (MLS) en el seu extrem amino-terminal. Aquest MLS és eliminat durant el transport d'aquestes proteïnes al mitocondri i en resulta l'exposició del domini IBM. Entre aquestes proteïnes trobem una proteasa de serines de mamífers HtrA2/Omi. Després de la sortida del mitocondri, el motiu IBM permet a aquesta proteïna la unió a IAP i la desinhibició de l'activitat caspasa. Les observacions dels ratolins *mnd2* (*motor neuron degeneration 2*) que presenten una mutació en un residu no catalític de la serina de HtrA2/Omi, va evidenciar el paper d'aquesta proteasa en el manteniment de la funció mitocondrial (Jones JM et al., 2003). El paper principal de HtrA2/Omi és probablement encarregar-se de les proteïnes mal plegades del mitocondri, és a dir, una funció tipus xaperona. Però, secundàriament, participen també en la inducció de l'apoptosi per la seua capacitat d'unir els IAPs.

La presència d'aquest motiu IBM en moltes proteïnes mitocondrials permet especular sobre la funció tàctica d'aquest motiu. És possible que el motiu IBM serveixi a les proteïnes mitocondrials alliberades al citoplasma per unir-se a IAPs. Els seus dominis *RING* actuarien com enzims E3 i enviarien les proteïnes amb motiu IBM a la via proteosomal. En aquest cas, l'habilitat d'aquestes proteïnes per induir apoptosi seria un efecte secundari de la unió als IAPs (Vaus i Silke, 2003).

Una altra proteïna mitocondrial que pot antagonitzar la funció dels IAPs és SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase* i *Direct IAP binding protein with low pI*, respectivament), que rep dos noms perquè va ser purificada per dos grups independents a la vegada (Du et al, 2000; Verhagen et

al, 2000). Aquesta proteïna, contràriament a HtrA2/Omi, no presenta activitat proteasa i no està clar si pot presentar una funció diferent de la pro-apoptòtica (Jiang i Wang, 2004).

Altres proteases que han cobrat gran rellevància en la regulació de la permeabilització mitocondrial són la caspasa-2 (Lassus et al., 2002) i granzima B. Aquestes proteïnes actuen en un pas previ a l'alliberament de citocrom c. En alguns casos, s'ha descrit que actuen sense precisar de l'ajut de Bid o altres proteïnes de la família de Bcl-2. Es pensa que caspasa-2 juga un paper en l'apoptosi iniciada per la proteïna β -amiloide, la privació de factors tròfics i granzima B. Malauradament, la manca d'un fenotip clar del *knock-out* d'aquesta proteasa juntament al desconeixement del seu mecanisme d'activació i dianes, han restat rellevància al paper de la CASP2 en l'apoptosi (Tinel et al., 2004). Alguns estudis mostren que l'activitat caspasa no és necessària per l'alliberament de citocrom c i sí que ho és per la pèrdua de potencial mitocondrial. En conclusió, aquestes i altres evidències bibliogràfiques deixen oberta la qüestió de si la formació de l'apoptosoma és un mecanisme d'amplificació de l'activitat caspasa més que un punt d'inici de la mort apoptòtica.

3.4.4 AIF

AIF (*apoptosis inducing factor*) és una flavoproteïna altament conservada a nivell filogenètic i que juga un paper essencial durant el desenvolupament embrionari (Joza et al, 2001). Es codificada en un gen nuclear i es sintetitza com un precursor immadur amb una senyal de localització mitocondrial (MLS) d'uns 100 aminoàcids en el seu extrem amino-terminal. Durant el seu import a l'espai intermembranari mitocondrial, el MLS és eliminat i la proteïna es plega incorporant un nucleòtid flavina adenina, FAD (Susin et al, 1999). La flavoproteïna resultant té aproximadament 57 kDa de pes molecular i presenta una activitat redox que li permet actuar com una oxidasa de NADH. Durant l'apoptosi, AIF passa del mitocondri al nucli, interacciona amb l'ADN i indueix la condensació de la cromatina (Ye et al, 2002). Un dels reguladors positius de l'apoptosi induïda per AIF és la ciclofilina A, que interacciona amb AIF per a formar una DNasa activa (Cande et al, 2004). A més a més, AIF interacciona amb HSP70, una proteïna citoprotectora que funciona com un inhibidor endogen d'AIF (Ravagnan et al, 2001).

Els treballs de Arnoult et al. amb mitocondris aïllats de fetge de rata suggerien que la sortida de AIF de mitocondri és dependent de caspases i, per tant, que el pan-inhibidor z-VAD-fmk previndria l'alliberament de la flavoproteïna. En aproximacions posteriors del mateix grup es va demostrar que Bax i tBid promouien l'alliberament de Cyt c eficientment en mitocondris aïllats sense sortida de AIF. Un darrer experiment evidenciava que, en separar la membrana mitocondrial externa de la interna Cyt c es solubilitzava amb facilitat, mentre que AIF, quedava unit a la interna. Aquesta adhesió diferencial d'AIF estaria influenciant la seua sortida, de manera que en certs casos estaria retardada respecte a la de Cyt c

o bé no s'arribaria a produir. Aquest grup postula que, és precisament l'acció de les caspases o d'altres proteases, la que estaria produint l'alliberament diferencial de les proteïnes de l'espai intermembranari.

S'ha proposat un model d'alliberament de proteïnes mitocondrials que exposem a continuació. Inicialment, es permeabilitzaria la membrana mitocondrial externa d'una manera no extensiva, això permetria la sortida de certes proteïnes solubles i petites de l'espai intermembranari com Cyt c i Smac/DIABLO sense que altres proteïnes menys solubles i més grans fossin alliberades. Les proteïnes d'aquesta primera onada desencadenarien una segona onada de sortida gràcies a l'activació de les caspases, que es traduiria en una permeabilització generalitzada mitocondrial i la sortida de proteïnes com AIF.

Quan s'analitza el paper de moltes proteïnes alliberades durant l'apoptosi mitocondrial, hom oblida que aquestes proteïnes intervenen en el funcionament normal de la cèl·lula. A nivell mitocondrial, Cyt c és un transportador d'electrons de la cadena respiratòria i un neutralitzador de l'anió superòxid. EndoG, per exemple, és una endonucleasa que actua reparant i mantenint la integritat de l'ADN mitocondrial i, AIF és una flavoproteïna amb poder antioxidant (Susin et al, 1999). Els estudis sobre AIF realitzats per Klein et al. (2002) es basen en l'ús del ratolí arlequí (Hq). Aquest ratolí va ser descrit fa més de 10 anys com un ratolí mutant sense pèl amb alguns defectes neurodegeneratius. A nivell molecular, el ratolí arlequí té un gen d'AIF amb una inserció proviral que fa que la seua expressió es vegi reduïda en un 80% a teixits com el neural. Els defectes neurodegeneratius i la retinopatia que presenten correlaciona empíricament amb l'augment demostrat de dany oxidatiu i una apoptosi augmentada en aquests teixits "in vivo". Sembla ser que el manteniment en el ratolí de teixits com el neural, el de la retina i el del cor són, en gran mesura, dependents del paper antioxidant d'AIF. D'altra banda, s'ha provat que la transfecció de les cèl·lules del ratolí Hq amb un vector expressor de AIF les rescata de la major susceptibilitat al peròxid d'hidrogen. Només en una circumstància descrita per Klein et al. (2002) les cèl·lules dels ratolins Hq mostraven una apoptosi reduïda respecte als seus controls, estem parlant de la privació sèrica. Les propietats de les cèl·lules del ratolí Hq són similars a les del ratolí *knock-out* d'AIF. En ambdues situacions les cèl·lules no presenten diferències en la resposta al tractament a estaurosporina o llum ultraviolada respecte les cèl·lules control, però per contra, són més resistents a l'apoptosi induïda per la privació sèrica. Sota aquesta perspectiva AIF només resultaria ser essencial en el inici de determinades vies apoptòtiques i aquest fet estaria en relació a la seua activitat protectora del potencial redox.

Als treballs de Susin et al.(1999), l'addició de AIF recombinant a nuclis aïllats de cèl·lules Hela, induïa la condensació i fragmentació d'alt pes molecular de l'ADN. Ambdós fenòmens eren caspasa independents. El treball de Wang i els seus col·legues (2002b) amb WAH-1 (és d'homòleg d'AIF en el cuc *Caenorabditis elegans*) ha aclarit en part el paper d'AIF en la fragmentació de l'ADN en evidenciar que

l'homòleg d'EndoG a *C. elegans* (CSP-6) és la parella funcional d'APAF-1 (WAH-1) durant la degradació de l'ADN.

En conclusió, podem considerar que la flavoproteïna AIF, a l'igual que Cyt c, és una proteïna sostenidora de la vida i a la vegada inductora de mort.

3.5 APOPTOSI INICIADA EN ALTRES ORGÀNULS.

Les funcions del Reticle endoplasmàtic (RE) són:

1. La síntesi i plegament de proteïnes.
2. L'emmagatzemament del calci, emprat com a segon missatger en la senyalització intracel·lular.
3. La biosíntesi d'esteroides, colesterol i altres lípids.

L'adequada realització d'aquests processos es basa en la presència de nombroses xaperones, una alta concentració de calci i un entorn oxidant. Les proteïnes que són transportades al lumen del RE sofreixen modificacions post-traduccional i el plegament necessari per una activitat òptima. Les proteïnes ben plegades surten del RE i són dirigides als compartiments subcel·lulars adequats, mentre que les que no han estat plegades o ho han estat malament, són exportades fora del RE i degradades (Rao et al, 2004).

L'alteració d'algun dels paràmetres que permeten el bon funcionament del RE, desencadena estrès en aquest orgànul. En resposta a aquest estrès es poden activar diferents vies com, per exemple, la de resposta a les proteïnes mal plegades o la de resposta a la sobrecàrrega de calci. L'activació de qualsevol d'aquestes vies, en funció de la intensitat del trastorn, pot acabar originant la mort apoptòtica.

Una gran varietat d'alteracions de l'entorn (per exemple els canvis en l'homeòstasi del calci), i de malalties genètiques estan associades a l'acumulació de proteïnes mal plegades. Aquestes situacions poden afectar a l'estructura, funció i integritat del RE. Entre les malalties genètiques trobem diversos desordres neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson, Huntington, l'esclerosi lateral amiotròfica i les malalties priòniques. En tots aquests casos, s'ha observat l'augment de les proteïnes mal plegades i l'aparició d'agregats d'aquestes que, independentment de si es produeixen dins o fora del RE, indueixen la resposta d'estrès. També existeixen compostos capaços d'induir l'estrès del RE com, per exemple, la thapsigargina, la brefeldina o la tunicamicina. L'estrès perllongat del RE causa el dany i el funcionament defectiu de l'orgànul que finalment induirà el procés de mort cel·lular.

La CASP12 (una CASP murina sense homòleg identificat a l'home) es troba associada al RE i s'activa en resposta a l'estrès d'aquest orgànul (Rao et al, 2001). Aquesta caspasa es pot activar de diferents

maneres. Per exemple:

- a. Per altres proteases. Per exemple, quan l'activació de la CASP12 es produeix pel tall de calpaïnes en resposta a l'estrès del RE o a la proteòlisi de la CASP7 (Rao et al, 2001).
- b. Per autoproteòlisi. La proteïna IRE1 activada en resposta a l'estrès del RE agrega la proCASP12 a la superfície de la membrana del RE a través de l'adaptador citosòlic TRAF2. El resultat és la proteòlisi i l'activació de la CASP12, presumptament per un mecanisme d'activació per proximitat (veieu l'apartat 3.1.2).
- c. Indirectament a través de la inserció de Bim, una proteïna *BH3 only*, al RE. Bim és alliberat del complex que forma amb la dineïna en resposta a estímuls tan variats com la llum UV o drogues com la tunicamicina, la doxorubicina o l'estaurosporina. A continuació s'inserta a la membrana del RE i posteriorment, s'ha suggerit que podria induir l'activació de la CASP12 a través dels canvis conformacionals i/o l'oligomerització de Bax/Bak (Morishima et al., 2004).

En aquestes situacions es tenen evidències de que la CASP12, juntament a la CASP9, inicien una via intrínseca de mort independent de la mitocondrial clàssica, és a dir, sense precisar la sortida de Cyt c i la formació de l'apoptosoma. Alternativament, s'ha descrit l'existència de senyals que connecten el dany del RE amb la via mitocondrial canònica. BAP31 és una proteïna transmembrana del RE que s'uneix a les proteïnes de membrana naixents en el trànsit entre el RE i el Golgi. Aquesta proteïna existeix formant un complex amb la CASP8 i els reguladors antiapoptòtics Bcl-2 o Bcl-X_L. L'estrès del RE i altres senyals apoptòtics provoquen el tall de BAP31 per la CASP8. Com a conseqüència d'aquest tall, apareix un fragment, anomenat p20, que causa successivament l'alliberament primerenc del calci del RE, la recaptació de calci per part del mitocondri i la inducció de la sortida de Cyt c, seguida per l'activació de les CASPs i l'apoptosi. És més, s'ha observat que el tall de BAP31 dependent de l'activació de la CASP8, estimula la fissió mitocondrial dependent de calci, afavorint la sortida de Cyt c. Aquestes observacions suggereixen que el fragment de BAP31 actuaria com un coordinador de les senyals de mort entre el RE i el mitocondri (revisat per Rao et al., 2004).

Adicionalment, l'augment de calci intracel·lular degut a l'estrès del RE, indueix l'activació d'unes proteases citosòliques, les calpaïnes (calcium-activated neutral proteases). Aquests enzims es troben normalment sota forma de zimògens al citoplasma i també es poden activar pel tall de les caspases. S'ha demostrat que en determinats models apoptòtics, les calpaïnes contribueixen al programa de degradació de substrats necessari pel desmantellament cel·lular. L'activitat de les calpaïnes és regulada negativament per la calpastatina, un substrat de tall de les caspases i de les pròpies calpaïnes activades. La interconnexió entre la cascada proteolítica de caspases i calpaïnes, es realitza a través de múltiples

proteïnes. En altres models, s'ha descrit l'existència d'una cascada de catepsines i calpaïnes, en la qual, les calpaïnes activades induïen la sortida de les catepsines dels lisosomes, i la subseqüent mort cel·lular (revisat per Bröker et al., 2005).

Les catepsines, juntament a altres hidrolases catabòliques, són presents dins dels lisosomes. Els lisosomes són orgànuls delimitats per una sola membrana lipídica que contenen un gran nombre d'enzims de degradació a un pH òptim. Clàssicament, han estat implicats en la mort autofàgica i la necrosi. Al mateix temps, es coneix que els enzims lisosomals són els responsables de la degradació inespecífica dins de les vesícules autofàgiques. S'ha plantejat també que una permeabilització regulada, no massiva, dels lisosomes podria induir la mort apoptòtica. Per exemple, s'ha descrit que la translocació lisosomal de membres pro-apoptòtics de la família de Bcl-2 podria induir la formació de porus i permetre la sortida d'alguns enzims lisosomals. (revisat per Bröker et al., 2005).

Les catepsines B, L (cisteïna proteases) i la catepsina D (aspàrtic proteasa) són les proteases més abundants dels lisosomes. Les catepsines B i D són les més estables al pH intracel·lular, i per això, es pensa que tenen el paper més rellevant en provocar la mort apoptòtica o necròtica. En alguns models de mort apoptòtica, per exemple diverses línies cel·lulars tumorals tractades amb TNF, la catepsina B s'activa en resposta a les caspases i actua com una proteasa efectora del desmantellament cel·lular (Foghsgaard et al., 2001). A part del paper d'aquests enzims com efectors de la cascada proteolítica, s'ha vist que també poden actuar com iniciadors d'apoptosi per via intrínseca en alguns models. Per exemple, a través de la proteïna pro-apoptòtica Bid, que presenta un lloc de tall per catepsines. Addicionalment, s'ha vist que en models limfocitaris induïts a morir amb baixes dosis d'estaurosporina, la catepsina D indueix l'activació de Bax i la sortida d'AIF del mitocondri (Bidère et al., 2003). Finalment, s'ha descrit que les catepsines poden tallar i activar directament les caspases. Aquestes evidències venen a confirmar que la permeabilització lisosomal és un esdeveniment capaç d'iniciar la cascada apoptòtica (revisat per Bröker et al., 2005).

L'aparell de Golgi és un orgànul format per diferents cisternes apilades. La seua funció principal és el processament i distribució dels lípids i les proteïnes en el seu pas des del RE a la membrana plasmàtica o a altres destinacions. Es sap que l'aparell de Golgi es desestructura en resposta a determinats estímuls apoptòtics. Això es fa, en part, a través del tall per caspases de proteïnes residents al Golgi. Per exemple la golgina-160, la GM130, la giantina, la GRASP65 i la p115. Entre les diferents caspases existents, només la CASP2 es localitza al Golgi (Troy i Shelanski, 2003). Aquest emplaçament característic l'ha fet una candidata idònia per iniciar l'apoptosi des d'aquest orgànul en resposta a diferents estressos, com per exemple, alteracions del tràfic de proteïnes a la membrana, de la pròpia estructura de l'orgànul o àdhuc, danys deguts a acumulacions de proteïnes malplegades al RE. Fins ara, es desconeix el mecanis-

me d'activació de la CASP2 al Golgi. Quant als seus substrats de tall, fins el moment s'han identificat dues proteïnes proteolitzades per la CASP2 al Golgi: la golgina-160 i la giantina. Tanmateix, moltes altres caspases processen durant l'apoptosi un gran nombre de proteïnes del Golgi. Aquest fenomen està relacionat amb el desmantellament d'aquest orgànel en situacions letals per la cèl·lula, ja que l'expressió de formes resistents a aquests talls, retarda la desestructuració del Golgi, però no l'apoptosi. D'altra banda, alguns estudis recents han vinculat fragments provinents del tall de proteïnes del Golgi amb senyals iniciadores de la cascada apoptòtica. S'ha vist que la golgina-160 podria ser una d'aquestes proteïnes. Maag et al. (2005) han evidenciat que l'expressió d'una golgina-160 sense llocs de tall per les caspases, frena també el tall de la forma endògena de la proteïna en resposta a determinats estímuls (estrés del RE o lligams dels DRs). Aquest fet suggereix que en determinats models de mort, el tall de la golgina-160 és un esdeveniment previ a l'activació de les caspases. D'igual manera, es va observar que el fragment de la golgina-160 provinent del tall de la CASP2 quan era expressat exògenament, es localitzava al nucli. Aquesta localització suggeria un paper de la forma proteolitzada en la transcripció de gens, per exemple, pro-apoptòtics. Addicionalment, s'havia observat una situació semblant amb la proteïna p115, que en condicions normals, intervé en el transport de vesícules al Golgi. La sobreexpressió del fragment carboxi-terminal de p115 va permetre constatar que el fragment es localitzava al nucli i que induïa la fragmentació del Golgi i l'apoptosi. A més, es va veure que la funció pro-apoptòtica del fragment de p115 era independent del desmantellament del Golgi. A diferència del cas de la golgina-160, el fragment provinent del tall de p115 prové del tall de la CASP3, fet que indica que el seu paper pro-apoptòtic sigui probablement dependent de l'activació de les caspases. Com a darrer punt, cal esmentar el possible paper en l'apoptosi del lípids del Golgi. S'ha observat que durant l'apoptosi, glicolípid com el GD3, són transportats des del lumen del Golgi al mitocondri, on es postula que indueixen la permeabilització de la membrana. El fre d'aquest transport pot impedir l'apoptosi. Aquestes observacions mostren la rellevància del transport de lípids entre el Golgi i el mitocondri durant l'apoptosi. Finalment, destaquem la presència d'un membre anti-apoptòtic de la família dels IAPs a les membranes del Golgi: BRUCE o també anomenat Apollon. Aquesta proteïna podria estar actuant com a fre local de l'activació d'una caspasa a nivell del Golgi (revisat per Hicks i Machamer, 2005).

3.6 INHIBIDORS FISIOLÒGICS D'APOPTOSI: SURVIVINA

Els IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*) van ser identificats per primera vegada l'any 1993, quan es va observar la presència d'unes proteïnes d'origen viral que impediien que les cèl·lules d'insecte infectades per baculovirus entressin en un programa de mort apoptòtica (Crook et al., 1993; Birnbaum et al., 1994). A partir d'aquesta primera troballa, s'han identificat més membres de la família a llevats, nemàtodes,

mosques de la fruita i humans (veieu la figura 3.15). La família dels IAPs presenta com a característica principal la presència d'un a tres dominis en "dits de zinc" d'aproximadament 70 aminoàcids, i que s'anomenen BIR (*baculoviral IAP repeat*). A través dels dominis BIR es produeix la unió a la CASP (veieu la figura 3.14). Malgrat que els IAPs actuen frenant l'activació de les CASPs, no s'ha demostrat que en tots els casos existeixi una interacció física de l'IAP i la CASP, per exemple en el cas de la survivina (Salvensen et Duckett, 2002). D'altra banda, molts membres de la família presenten un domini *RING finger* que és reconegut per mitjançar en les interaccions proteïna-proteïna. En aquest domini recau l'activitat ubiquitina lligasa (activitat E3), implicada en ubiquitinitzar i dirigir les proteïnes a la via de degradació del proteasoma.

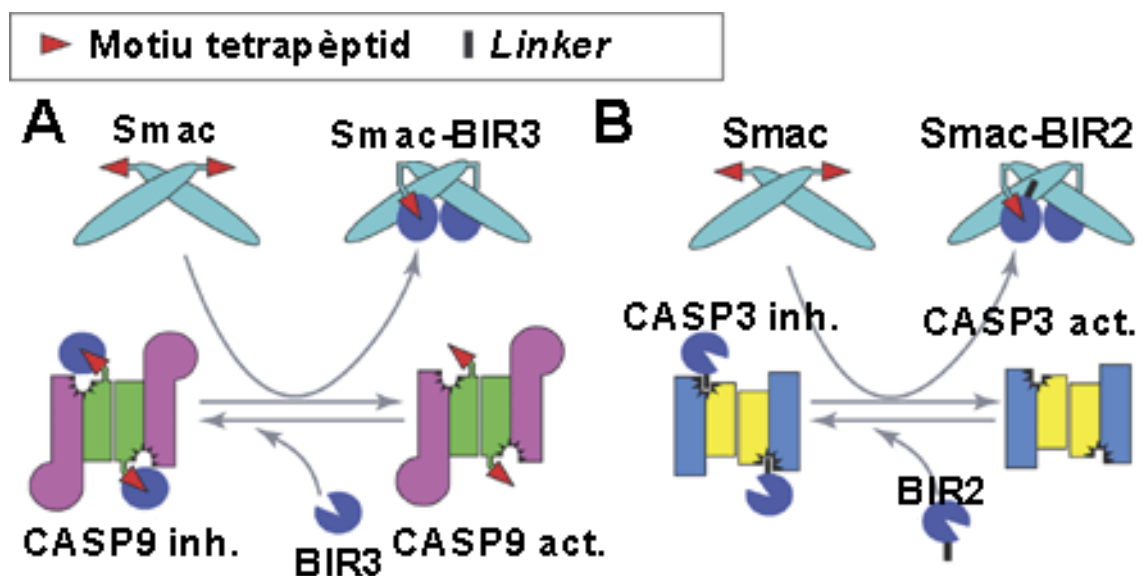


Figura 3.14. Mecanisme d'acció de XIAP bloquejant CASP3 i CASP9. Fre del bloqueig per Smac (Fesik i Shi., 2001). (A) La fletxa vermella representa el tetrapèptid conservat present a Smac (color turquesa) o a la subunitat petita de la CASP9 (verd). Aquest motiu s'uneix a un solc del domini BIR3 de XIAP (cercle blau fosc) i com a resultat, s'inhibeix la CASP9 (rosa i verd). El tetrapèptid present a Smac, competeix amb la CASP9 per unir-se a BIR3. Com a resultat, s'aixeca el fre a l'activació de la CASP9. (B) Un fragment de XIAP anomenat linker (rectangle gris) és el responsable del fre de l'activació de la CASP3 (blau i groc). La unió de Smac amb el BIR2 de XIAP, impedeix que el linker s'uneixi a la CASP3. El resultat és que es desbloqueja el fre a l'activació de la CASP3.

En humà s'han identificat vuit membres de la família dels IAP: c-IAP1, c-IAP2 (Rothe et al., 1995), XIAP (Duckett et al., 1996), NAIP (Liston et al., 1996), survivina (Ambrosini et al., 1997), apollon (Chen et al., 1999), ML-IAP/livin (Vucic et al., 2000; Kasof and Gomes, 2001), i ILP-2 (Richter et al., 2001). Entre aquests membres de la família dels IAPs, només la survivina i el ML-IAP/livin s'expressen amb major quantitat en cèl·lules transformades o tumorals que en teixits normals diferenciats (Li, 2003). La survivina presenta una sèrie de característiques diferencials que resumirem en els següents punts:

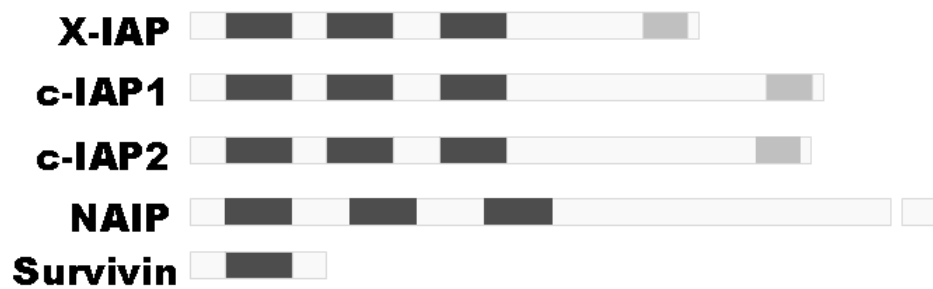
1. La seqüència nucleotídica de la survivina és l'evolucivament més divergent respecte a les dels altres IAPs (Kasof i Gomes, 2001). Per això, és comprensible que presenti una afinitat menor i sigui

IAPs

D. Melanogaster



H. Sapiens



C. elegans

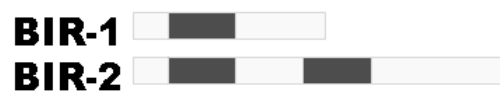


Figura 3.15. Estructura dels IAPs.

menys neutralitzada per Smac/DIABLO en comparació a la resta de membres de la família dels IAPs (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Vucic et al., 2002).

2. La survivina no conté el domini *RING finger* a l'extrem carboxil (veieu la figura 3.15), fet que caracteritza a altres membres de la família. En contrapartida a l'absència del domini *RING finger*, presenta un extrem carboxil amb una α -hèlix llarga que permet la interacció amb la microtubulina polimeritzada (Li et al., 1998a, 1999) i és l'únic IAP que homodimeritza en solució (Chantalat et al., 2000; Muchmore et al., 2000; Verdecia et al., 2000). Malgrat que la survivina no presenta activitat E3, sí s'ha observat que pot acceptar ubiquitines i entrar a la via de degradació proteasomal. En aquest sentit, algunes observacions recents descriuen l'existència d'un complex entre la survivina i hsp90 (*heat shock protein 90*). La disrupció d'aquest complex després d'un estrès cel·lular, indueix la degradació proteasomal de la survivina, l'apoptosi per via intrínseca i l'aturada del cicle cel·lular acompanyada de defectes en la mitosi (Fortugno et al., 2003).
3. La survivina s'expressa de forma general a tots els tumors humans més comuns, mentre que l'augment de l'expressió d'un altre IAP com ML-IAP/livin està predominantment restringit a melanoma (Ambrosini et al., 1997; Lu et al., 1998; Vucic et al., 2000; Kasof and Gomes, 2001). S'ha trobat una major expressió de survivina en estadis avançats de neuroblastoma i línies cel·lulars derivades del mateix tipus de tumor. Aquesta expressió augmentada s'explica pel guany d'una regió 17q on es troba el gen de la survivina i s'associa a un pitjor pronòstic. Algunes observacions indiquen que la inducció d'apoptosi en aquestes línies cel·lulars s'associa a una disminució elevada dels nivells de survivina (Islam et al., 2000).
4. La survivina és l'únic membre de la família amb una expressió dependent de la fase del cicle cel·lular. La quantitat de survivina expressada assoleix els màxims nivells a la fase G2/M del cicle. La survivina, a diferència dels altres IAPs, participa en la regulació de l'apoptosi i de la divisió cel·lular.

3.6.1 Expressió de la survivina

L'expressió de la survivina és variable al llarg de la vida d'un organisme. Durant el desenvolupament embrionari es detecten unes quantitats elevades de proteïna, mentre que, a l'organisme adult, disminueixen fins a ser indetectables. D'altra banda, s'ha observat que la quantitat de survivina augmenta en molts tipus de càncers. Es creu que aquest fet és un mecanisme tumoral d'evasió de l'apoptosi, que alhora, promou la progressió de mitosis aberrants i l'aparició d'aneuploïdies.

A nivell clínic, l'expressió de survivina en un tumor està associada a una menor supervivència, a la

resistència a la teràpia antitumoral i a un nivell accelerat de recidives. El tractament amb oligonucleòtids anti-sentit de survivina indueix apoptosi i, a la vegada, una major sensibilitat de les cèl·lules tumorals en front de la quimioteràpia (Olie, RA et al. 2000).

Existeixen gran nombre d'articles en la bibliografia que parlen de les implicacions de l'augment i la disminució de l'expressió de la survivina en diferents models tumorals. Els resultats en aquests assajos són contradictoris entre ells. Es pensa que això és així perquè existeixen diferents variants de *splicing* de la survivina que podrien diferir en la localització, l'expressió i la funció en cèl·lules tumorals. L'ús d'anticossos dirigits contra les diferents formes de la survivina han possibilitat la detecció de dos reservoris diferents de proteïna: un de citoplasmàtic i un de nuclear (Fortugno et al., 2002).

En paral·lel, s'ha observat una major expressió de survivina en cèl·lules mare hematopoètiques d'adult i en cèl·lules progenitores estimulades amb factors de creixement hematopoètics (Fukuda et Pelus, 2002; Fukuda et al, 2004). Al mateix temps, s'ha suggerit que la survivina podria tenir un paper en el desenvolupament, maduració i homeòstasi de les cèl·lules T (Xing et al, 2004). És més, Altnauer et al. (2004) han descrit la presència d'alts nivells de survivina en neutròfils immadurs i, sorprenentment, també en aquestes mateixes cèl·lules madures quan són estimulades "in vitro" amb CSF (factors estimuladors de colònies de granulòcits i macròfags) o "in vivo" en condicions d'inflamació. En resum, tots aquests resultats apunten a que la survivina podria tenir un paper més enllà de l'oncogènesi ja que podria estar implicada, per exemple, en la patogènesi, diagnosi i tractament de les malalties inflamatòries (Altnauer et al, 2004; Zangemeister-Wittke et Simon, 2004).

3.6.2 Localització de la survivina

Estudis d'immunofluorescència i de microscòpia confocal han demostrat que la survivina s'associa al centre organitzador de microtúbuls en interfase. En metafase s'uneix als centrosomes i al fus mitòtic i, posteriorment, es relocalitza a la placa metafàsica durant la telofase tardana (Li et al., 1998). La survivina interacciona amb varies proteïnes que es troben als centròmers: "in vivo" amb INCENP (*innere protein centromere*), amb Aurora B (Bolton et al., 2002) i amb CENP-B, un dels components constitutius dels centròmers.

Si parlem dels diferents compartiments cel·lulars, la ràtio de survivina nucleoplasmàtica versus la del citoplasma és de 1/6 (Fortugno et al., 2002). La funció de la survivina al nucli està bàsicament relacionada amb el cicle cel·lular, mentre que la citoplasmàtica realitza una funció bàsicament anti-apoptòtica (Zangemeister-Wittke i Simon, 2004). La seqüència proteica de la survivina presenta diversos llocs de fosforilació i acetilació. Concretament, la forma fosforilada a la Thr³⁴ és l'anti-apoptosant.

3.6.3 Regulació dels nivells de survivina

Els nivells de survivina, com el de moltes altres proteïnes, es poden regular a nivell transcripcional i/o a nivell post-transcripcional, per exemple, a través de l'estabilitat de la proteïna. La regulació de la survivina a nivell transcripcional és complexa i poc coneguda. Alguns dels punts interessants per abordar són: en primer lloc, l'estudi dels mecanismes que augmenten la producció de survivina durant la fase G2/M; en segon lloc, conèixer com es regula la producció de la proteïna a les cèl·lules tumorals respecte a les normals. Finalment, determinar l'existència de mecanismes diferencials reguladors dels nivells de survivina entre el desenvolupament embrionari i les cèl·lules canceroses.

Quant a la regulació de l'expressió constitutiva de la survivina a les cèl·lules tumorals, els articles publicats fins ara suggereixen un control complex, implicant interaccions múltiples de factors de transcripció. La regulació depenent de les diferents fases del cicle és fruit de: l'existència de diversos motius CHR (*cell cycle homology region*) i CDE (*cell cycle dependent element*) al nucli del promotor, (Li et al., 1998), però es desconeixen els factors que actuarien unint-se a aquestes regions. Es coneix també que certes regions fora del nucli del promotor actuen regulant la survivina de forma constitutiva i també dependent del cicle.

D'altra banda, existeixen altres formes de regulació dels nivells de survivina com, per exemple, les reallitzades pels factors de creixement/citocines, les hormones, o alguns fàrmacs com són els inhibidors de CDKs. En aquest darrer grup s'inclou, per exemple, la roscovitina, que és capaç de disminuir l'expressió de la survivina i de XIAP en cèl·lules de glioma induïdes a morir amb TRAIL (Kim et al., 2004).

Paral·lelament, s'ha observat que el tractament amb altres fàrmacs pot modificar els nivells de survivina. Per exemple, els taxols, concretament el paclitaxel (PTX), causen l'augment dels nivells de survivina. Aquest fet es produeix per l'activació de les vies PI3K/Akt i MAPK. La inhibició d'aquestes vies de senyalització, disminueix la inducció de la survivina i fa que les cèl·lules siguin més sensibles a la mort pel taxol (Ling et al., 2004). A la línia de neuroblastoma SK-N-SH, s'ha vist que la inhibició de PI3K/Akt amb LY294002, disminueix els nivells de ARN missatger, tant de la proteïna c-IAP1, com de la survivina. En aquest model, el tractament amb LY294002 implica que la mort en resposta a TRAIL sigui superior (Kim et al., 2004). Alternativament, es coneix que alguns compostos que activen la proteïna p53 també presenten activitat inhibidora de l'expressió de survivina. Això és així ja que la proteïna p53 activa és capaç d'inhibir la transcripció de la survivina (Hoffman et al., 2002). Aquest és el cas de la doxorubicina, un inductor de dany a l'ADN. S'ha observat que el tractament de diverses línies cel·lulars leucèmiques amb doxorubicina, activa p53 i que aquest disminueix els nivells de survivina. Com a conseqüència de la disminució de la survivina, les cèl·lules en G2/M moren per apoptosi (Zhou et al., 2002). El potencial de p53, inhibint l'expressió de survivina, s'ha corroborat a través d'altres models cel·lulars. Finalment,

s'ha observat que un altre membre de la família de p53, p73 β , també és capaç de disminuir l'expressió de la survivina (Hoffman et al., 2002).

3.6.4 Regulació de l'apoptosi per survivina

El paper de la survivina en la transició G1/S és encara poc conegut i no s'ha pogut relacionar amb la regulació de l'apoptosi en aquesta fase del cicle, en canvi, sí s'ha vist una correlació entre l'expressió d'aquesta proteïna i la proliferació. Suzuki et al. (2000) evidencien que, en models tumorals, la survivina competeix amb p16^{INK4a}, un inhibidor fisiològic de l'activitat de les CDKs, per l'unió amb CDK4. El resultat és un augment de la progressió a fase S i de la resistència a la parada en G1 (Suzuki et al., 2000).

La survivina forma part de les proteïnes del *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic i, com el seu nom indica, promou la supervivència. S'han descrit augments de la quantitat de survivina en models tumorals, fet que s'associa a un increment de la resistència a l'apoptosi. Per exemple, en el cas de diferents línies d'origen neuronal, la inhibició de la survivina mitjançant aproximacions de RNA anti-sentit, provoca la disminució de la viabilitat cel·lular. En aquestes condicions, la mort induïda correspon al tipus "catàstrofe mitòtica" i en funció de la línia cel·lular és rescatada o no, per un inhibidor general de les caspases (Shankar et al., 2001).

Alternativament, s'ha formulat la hipòtesi que la survivina podria tenir un paper en la resistència a la quimioteràpia. Els treballs de Chandele et al. (2004) mostren que les poblacions de cèl·lules tumorals sincronitzades en G2/M, amb una major expressió de survivina, són més resistents a la mort induïda per STS, en comparació amb les mateixes cèl·lules en G1, que expressen una menor quantitat de la proteïna. Cal destacar que la mort induïda en aquesta subpoblació és dependent de l'activació de la CASP9.

El *checkpoint* dels fus mitòtic monitoritza l'anclatge dels cromosomes als microtúbuls d'ambdós pols de la cèl·lula, al mateix temps que detecta els defectes d'unió dels microtúbuls als cinetocors. L'activació d'aquest *checkpoint* en resposta a diversos estímuls, indueix la parada proliferativa i, alternativament, la mort cel·lular. Diversos agents antitumorals actuen a través del *checkpoint* del fus, entre ells es troben aquells dirigits a disruptar la dinàmica dels microtúbuls, és a dir, els tòxics de microtúbuls. Estudis recents mostren que el tractament amb taxol indueix un augment de l'expressió de la survivina i una activació sostinguda de la CDK1. Els dos anteriors esdeveniments afavoreixen la supervivència del tumor, és a dir, l'aparició de resistències als taxols durant la mitosi (O'Connor et al., 2002). Per aquest motiu el paper de CDK1 en el *checkpoint* de supervivència cobra una gran importància en cèl·lules tumorals, i proporciona noves perspectives terapèutiques com ara el tractament seqüencial amb fàrmacs antitumorals i inhibidors de CDK1 (Li, 2003).

El mecanisme pel qual la survivina actua induint supervivència no és simple, precisa de l'expressió de la proteïna i de molts altres passos, entre ells l'estabilització de la molècula a través de la fosforilació en un residu de treonina. La survivina és fosforilada a la Thr³⁴ pel complex CDK1/ciclina B1, al que també s'ha anomenat MPF (O'Connor et al., 2000). Aquesta fosforilació és necessària perquè s'associï als microtúbuls polimeritzats del fus mitòtic i freni l'activació de la CASP9 durant aquesta fase del cicle. La construcció d'una forma mutant de la survivina que no podia ser fosforilada a la treonina, va evidenciar la importància d'aquesta fosforilació per la seua activitat antiapoptòtica. En part, degut a que la fosforilació era necessària per estabilitzar la survivina i impedir que fos degradada ràpidament per la via proteasomal. La sobreexpressió del mutant provoca la dissociació del complex survivina/CASP9 de l'aparell mitòtic, i l'apoptosi dependent de la CASP9 (O'Connor et al., 2000). Aquests resultats suggerien que el fre de la fosforilació de la Thr³⁴ era una estratègia interessant per fer front a l'aparició de resistències als taxols. Diferents aproximacions terapèutiques van ser utilitzades, entre les quals destaquem: la inhibició farmacalògica amb flavopiridol, olomoucina, purvalanol A i alterpaulona. Els fàrmacs s'administraven seqüencialment després del PTX. Els resultats eren la inducció d'una apoptosi generalitzada i el conseqüent fre del creixement tumoral. Un altre quimioteràpic clàssic és la doxorubicina. El mecanisme d'acció d'aquest fàrmac és la inhibició de la topoisomerasa II. A través d'aquest fet, s'activa p53, i aquest inhibeix transcripcionalment els nivells de survivina (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002; Zhou et al., 2002). Durant els tractaments seqüencials amb doxorubicina i flavopiridol, es potenciaven els efectes pro-apoptòtics dels dos fàrmacs per separat i s'inhibia el creixement tumoral de xenotransplantaments (Wall et al., 2003).

El paper de la survivina regulant l'activació de la CASP9 durant la mitosi ha plantejat la possibilitat de que sigui capaç d'inhibir l'activitat d'altres caspases. El domini BIR de la survivina proporciona un domini d'interacció amb les CASPs per inhibir-les. En aquest sentit, experiments "in vitro" han demostrat que la survivina s'uneix a la CASP3 i CASP7 i no a la CASP8 de manera que aquest fet proporciona arguments a favor de l'especificitat de la interacció (Tamm et al., 1998). A llevat, l'expressió de la survivina ha demostrat que és capaç d'inhibir la citotoxicitat induïda per l'activació de CASP3, encara que d'una manera menys eficaç que c-IAP1, c-IAP2 i XIAP (Wright et al., 2000). Resultats similars s'han obtingut en cèl·lules de mamífer expressant una forma autoactivable de CASP3 (Wright et al., 2000). Encara que la survivina presenti la capacitat d'inhibir directament les caspases en sistemes *cell free*, les observacions realitzades en sistemes més fisiològics suggereixen que el seu paper anti-apoptòtic és a través de la competició per Smac/DIABLO (Song et al, 2003), i no la inhibició directa de les CASPs.

Un estudi recent mostra que la survivina forma complexes amb la proteïna HBXIP (*hepatitis B X-interacting protein*), que és expressada en diferents tipus cel·lulars independentment de la infecció pel

virus de l'hepatitis (Marusawa et al, 2003). Marusawa i els seus col·legues (2003) mostren que la survivina només pot unir-se a la proCASP9 quan s'ha unit prèviament a HBXIP, i que aquest fet impedeix el reclutament del zimògen de CASP9 a nivell de l'apoptosoma. HBXIP estaria actuant com un cofactor de la survivina. És més, Dohi et al. (2004) han evidenciat que la survivina interacciona a través del seu domini BIR amb XIAP. Aquesta interacció augmenta l'estabilitat de l'IAP i permet inhibir sinèrgicament l'activació de la CASP9 en resposta a estímuls pro-apoptòtics. Un resum del paper hipotètic de la survivina i de les proteïnes amb què interacciona en el control de l'apoptosi es mostra a la figura 3.16.

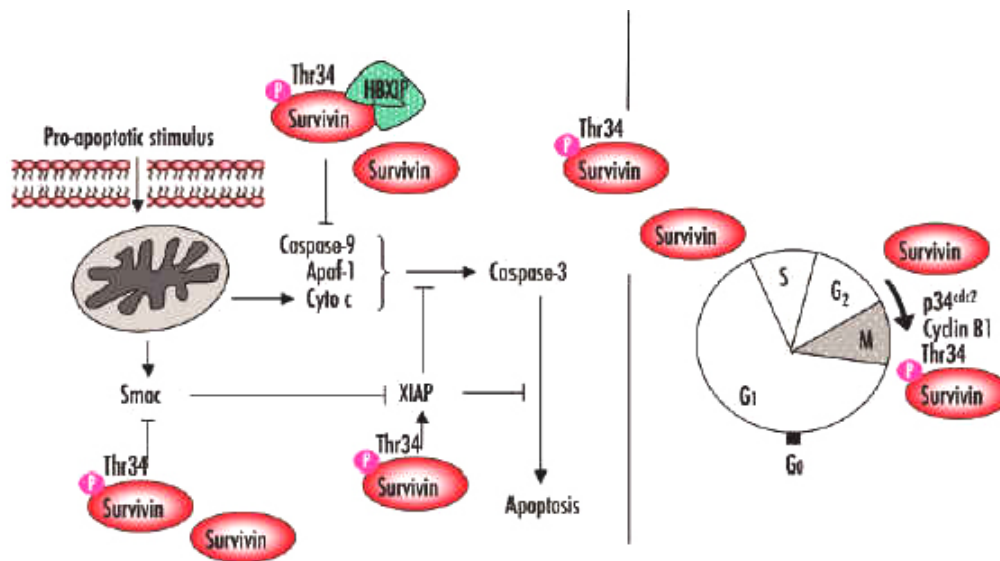


Figura 3.16. Paper hipotètic de la survivina i de les proteïnes amb qui interactua en el control de l'apoptosi. La survivina i la seua forma estabilitzada per fosforilació són suposadament transportades entre el nucli i el citoplasma. Al nucli, la survivina s'uneix als microtúbuls i assisteix la segregació cromosomal i la citocinesi durant la mitosi. Al citoplasma, la survivina inhibeix l'apoptosi a través de la seua interacció amb CASP9 a través del cofactor XBXIP, de l'unió a Smac i de l'associació a XIAP. Les dades actuals semblen indicar que la survivina actua com un vincle entre la maquinària apoptòtica i els *Checkpoints* (Zangemeister-Wittke et Simon, 2004).

Finalment, s'ha descrit que la survivina podria estar actuant per mecanismes caspasa independents. Per exemple, en el cas d'algunes línies de neuroblastoma, la disminució de la quantitat de survivina amb oligonucleòtids anti-sentit desencadena una mort caspasa independent, mentre que en altres línies d'oligodendrioma la mort és caspasa dependent (Shankar et al., 2001). Aquestes evidències suggereixen que en funció de la línia cel·lular, la survivina està modulant la mort caspasa dependent o la independent.

APOPTOSI I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Els *checkpoints* cel·lulars vetllen pel manteniment de la integritat gènica ja que són capaços d'interrompre el cicle en cas de detectar dany (veieu l'apartat 1.1). En organismes pluricel·lulars, els *checkpoints* poden activar addicionalment un mecanisme més evolucionat, l'apoptosi. En cas de lesions cel·lulars deletèries, l'activació del programa apoptòtic és necessària per eliminar la cèl·lula danyada d'una manera silenciosa, és a dir, sense provocar danys a les cèl·lules veïnes. Lògicament, els mecanismes que possibiliten la interacció entre cicle, danys a l'ADN i apoptosi són objecte d'una intensa investigació.

Una proteïna implicada en el *checkpoint* de G1 a S és c-Myc. Aquesta proteïna pertany a una família de factors de transcripció caracteritzats per contenir un domini "hèlix-llaç-hèlix" i un de cremallera de leucines. c-Myc heterodimeritza amb Max per regular la transcripció de gens amb caixes E de resposta¹. S'ha observat que la interacció amb Bin1 (*box-dependent Myc-interacting protein 1*) és necessària pels efectes proapoptòtics de c-Myc (Matsumara et al., 2003). Aquest factor de transcripció no s'expressa en cèl·lules quiescents, però s'indueix de forma ràpida en resposta als factors de creixement (GF) i indueix l'expressió de proteïnes necessàries per la progressió de G1 a S. De fet, els ratolins *knock-out* per c-Myc, presenten letalitat embrionària. L'activació massiva d'aquest gen, en models de cèl·lules en cultiu, ha indicat que, a més a més d'augmentar la proliferació, també indueix la mort apoptòtica dependent o independent de p53. L'alternança entre la proliferació o la mort induïda per c-Myc podria dependre de la presència de senyals de supervivència col·laterals. El grup de Gerard Evan va examinar l'equilibri entre les dues situacions en un model "in vivo". Aquest grup va generar ratolins transgènics que expressaven una proteïna de fusió que contenia c-Myc i que era susceptible de ser induïda amb tamoxifè. Quan c-Myc s'expressava en els illots β -pancreàtics, s'observava un pic de proliferació acompanyat d'una resposta apoptòtica dominant. L'activació de c-Myc suposava la degeneració dels illots. La retirada del tamoxifè, seguida de la caiguda dels nivells de c-Myc, provocava la regeneració d'uns illots funcionalment actius. La sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-X_L permetia, al mateix temps que l'activa-

¹Una caixa E és el lloc de l'ADN que presenta la seqüència consens CANNTG (on N és qualsevol nucleòtid). Aquestes caixes són molt freqüents al llarg del genoma i típicament, són el lloc d'unió de factors de transcripció tipus bHLH (*basic helix-loop-helix*, que és un domini estructural de reconeixement de l'ADN). Les proteïnes Myc i Max són factors de transcripció amb aquest motiu.

ció de c-Myc, l'expansió dels illots i la formació de tumors pancreàtics (Pelengaris et al., 2002). Malgrat les anteriors observacions, c-Myc no causa una alternança entre la proliferació i l'apoptosi en tots els paradigmes experimentals. Per exemple, l'activació de c-Myc en cèl·lules mare de la capa basal de l'epidermis produeix una hiperproliferació sense apoptosi concomitant i es generen papil·lomes epidèrmics. Una explicació plausible és que en aquestes capes basals de l'epidermis existeixi prèviament un entorn permissiu que eviti l'apoptosi associada a l'augment de la proliferació. Una evidència que ho suggereix és que les cèl·lules de les capes basals de la pell, sobre-expressores de c-Myc, moren apoptòticament quan s'allunyen del seu teixit origen i envaeixen el teixit connectiu circumdant (Pelengaris et al., 1999).

Una de les vies de regulació del cicle més freqüentment afectada en molts tumors humans és la de la proteïna retinoblastoma (Rb). Aquest gen supressor de tumors es troba implicat en la transició G1/S i el seu funcionament està afectat en gran part dels tumors humans (Senderowicz, 2003). La inactivació de Rb pot produir-se en comptades ocasions mitjançant una alteració directa de la proteïna (retinoblastoma, osteosarcomes, tumor de mama,...) o més freqüentment per l'hiperfosforilació de Rb. Aquesta hiperfosforilació pot ser el resultat d'una elevada activació de les CDKs causada, per exemple, per la sobre-expressió de la ciclina D1. La proteïna Rb actua com a fre de la proliferació perquè antagonitza la família de factors de transcripció E2F, els quals promouen, en condicions basals, el pas entre les diferents fases del cicle. Al mateix temps, Rb actua frenant l'apoptosi perquè s'ha vist que les proteïnes de la família d'E2F poden promoure aquest tipus de mort de forma dependent i independent de la proteïna p53. La família de E2F inclou 6 proteïnes classificades en 3 subgrups diferents. Un d'aquests grups és el format per E2F1, E2F2 i E2F3. Els membres d'aquest grup s'expressen només en cèl·lules proliferants i es caracteritzen per unir-se preferentment a Rb entre les diferents proteïnes de la família de les *pocket proteins*. D'altra banda, E2F1 forma complexos amb la família de gens DP (DP-1 i DP-2). S'ha vist que E2F1 indueix apoptosi en models "in vitro" i existeixen evidències que suggereixen que també ho fa "in vivo". Quant als altres membres de la família d'E2F (E2F2 al 5), existeix controvèrsia al voltant del seu paper pro-apoptòtic (Matsumura et al, 2003). Aquestes observacions evidencien que la mort i la proliferació presenten mecanismes de regulació compartits i, a més a més, suggereixen que E2F podria ser un dels candidats idonis per acoblar els dos processos. Els resultats de les anàlisis d'expressió gènica basats en la tecnologia dels *microarrays* han mostrat que aquest factor de transcripció augmenta l'expressió d'un gran nombre de gens implicats en el cicle cel·lular i, addicionalment, també la d'alguns gens implicats en l'apoptosi. L'apoptosi via E2F es produeix a través de l'expressió de proteïnes que involucren al mitocondri com eix central del mecanisme de mort, però també altres que poden actuar independentment d'aquest orgànu, per exemple les procaspases. Alguns dels gens induïts per E2F codifiquen per 14ARF, Apaf-1, p73 i diverses proteïnes *BH3 only* (entre elles, PUMA, NOXA, BIM i Hrk/DP5). Recentment, s'ha descrit que la proteïna DIP (*death inducing protein*) és una diana transcripcional de E2F. Estudis de

localització suggereixen que DIP es situa a nivell del mitocondri. Resulta interessant que quan els nivells proteics de DIP són suprimits a través de l'ARN d'interferència, es produeix una reversió quasi completa dels efectes apoptosants derivats de l'augment d'activitat E2F1. Aquest fet suggereix que DIP podria ser un element essencial en l'apoptosi via E2F. Addicionalment, s'ha observat que, a l'anterior model, la inhibició farmacològica de les caspases és insuficient per frenar l'apoptosi dependent de l'expressió de DIP, fet que fa pensar que aquesta proteïna provoca una apoptosi caspasa-independent (Dynlacht, 2005). En diversos models de guany de funció d'E2F, concretament quan la proteïna és directament sobre-expressada, quan la proteïna Rb és inactivada, o quan es desregula l'expressió d'E2F per la proteïna adenoviral E1A, es va observar que E2F induïa directament l'expressió de la proforma de la CASP7, i probablement també altres caspases com la 3, la 8 i la 9 (Nahle et al, 2002). En els sistemes examinats, l'augment de l'expressió de les proCASPes dependent d'E2F, no era suficient per induir apoptosi encara que feia a les cèl·lules més sensibles a la mort amb agents pro-apoptòtics. Observacions independents recolzaven les conclusions dels estudis d'expressió gènica amb E2F. Per exemple, es va observar que en les cèl·lules que passaven de la quiescència a la fase S es produïa una acumulació de les procaspases. També es va constatar que els MEFs (*mouse embryonic fibroblast*) Rb-/- expressaven nivells superiors de CASPs respecte els MEFs control.

Totes aquestes evidències ens fan plantejar el pes específic d'E2F respecte al de c-Myc en el control del balanç apoptosi/proliferació. E2F1 indueix directament l'expressió de c-Myc. De manera recíproca, c-Myc indueix l'expressió d'E2F1, E2F2 i E2F3. És més, c-Myc, a través de mecanismes dependents de l'activitat de les CDKs, allibera a E2F1 de Rb. En conclusió, c-Myc i E2F1 es potencien recíprocament. Recentment, Leone et al. (2001) han descrit que c-Myc no pot potenciar l'apoptosi en resposta a privació sèrica en MEFs E2F1 -/-. Altres grups han descrit situacions on E2F1 és necessari pel paper pro-apoptòtic de c-Myc, però de moment no s'han aportat encara evidències contundents sobre la relació entre aquests dos factors de transcripció en la inducció d'apoptosi (Matsumara et al., 2003).

Altres evidències de la relació entre la maquinària de cicle i l'apoptòtica són les que relacionen la CASP2 i la ciclina D3. La ciclina D3 és un membre de la família de la ciclina D que regula la fase inicial de la transició de G1 a S. S'ha comprovat que la ciclina D3 interacciona físicament amb la CASP2 en llevats i fibroblasts de mamífer. Les línies tumorals forçades a expressar la ciclina D3 i la CASP2 presenten més apoptosi que aquelles que només expressen la CASP2. La coexpressió fa que augmenti la quantitat de CASP2 fragmentada i també la quantitat total d'enzim. Els resultats apunten a que la interacció amb la ciclina D3 estabilitzaria la CASP2 i promouria el seu tall activador. Aquest mateix grup suggereix que el significat biològic de l'augment de CASP2 en cèl·lules sobreexpressores de la ciclina D3 podria ser el de contrarestar els efectes de les proteïnes inhibidores de l'activitat caspasa per eliminar les cèl·lules que

prolifereix d'una manera inapropiada en el context de l'organisme (Mendelsohn et al, 2002).

Els complexos de les CDKs orquestren el pas d'una fase a l'altra del cicle cel·lular a través de les fosforilacions de diferents substrats. Aquest fet és així en totes les espècies eucariotes estudiades però en canvi, no sembla que les CDKs tinguin un paper en tots els models d'apoptosi (Golsteyn, 2005). Un dels primers experiments que relacionaven l'apoptosi i l'activitat d'un complex CDK/ciclina és el realitzat amb les cèl·lules de limfoma YAC. En aquest cas, es realitzava una coïncubació de les cèl·lules amb granzima B i perforina. La incubació amb aquests dos compostos desencadenava l'apoptosi. Quan es recuperaven per immunoprecipitació els complexos de CDK1, després del tractament, s'observava que l'activitat cinasa dels complexos recuperats augmentava fins assolir nivells semblants als presents en les cèl·lules bloquejades en mitosi. Quan s'examinava l'estat del residu de tirosina de la CDK1, aquest estava desfosforilat indicant que la CDK1 havia estat activada per WEE1/Cdc25. Altres evidències de la implicació de CDK1 en l'apoptosi són les proporcionades pels experiments realitzats sobre la línia cel·lular FT210, caracteritzada per presentar, en aquest cas, una forma termosensible del gen de CDK1. El tractament de les FT210, en condicions permissives de temperatura amb la perforina i la granzima B, induïa apoptosi. La proporció d'apoptosi es reduïa fins un 25% quan s'induïa l'expressió de la forma inactiva de la CDK1. Tots aquests experiments relacionaven l'activitat d'un complex CDK/ciclina (la CDK1 en aquest cas) i l'apoptosi.

Altres experiments, utilitzant diverses aproximacions, han resultat útils per relacionar l'activitat CDK i l'apoptosi. Estem parlant de les aproximacions genètiques així com de l'ús dels inhibidors farmacològics. Harvey i els seus col·laboradors (2000) van examinar l'activitat de la CDK2 en les Hela induïdes a morir apoptòticament amb estaurosporina. Després de l'expressió d'una forma dominant negativa de CDK2 sense activitat catalítica, van poder observar que aquestes cèl·lules mostraven en menor percentatge una condensació de la cromatina en comparació a les cèl·lules control. La condensació de la cromatina és un aspecte morfològic característic de les cèl·lules que moren per un procés apoptòtic. Aquest mateix grup va voler veure si l'expressió d'una forma dominant negativa d'una altra CDK era també capaç de disminuir el nombre de cèl·lules amb el nucli condensat en el seu model. Amb aquesta finalitat, van expressar una forma dominant negativa de la CDK1 i no es va produir el fenomen. Aquest darrer experiment mostrava el paper específic de la CDK2 en aquest sistema. Aquest grup va constatar que, en presència del dominant negatiu de la CDK2, els altres trets apoptòtics, com l'exposició de la fosfatidil serina o l'activació de les caspases, continuaven produint-se. Harvey i col·legues van concloure que la via apoptòtica seguia sent activada en les Hela transfectades amb una forma dominant negativa de CDK2, i que només alguns dels esdeveniments cel·lulars associats a l'apoptosi eren evitats. És per això, que en aquest model, aquest grup va emplaçar l'activació de CDK2 en un punt posterior a l'activa-

ció de les caspases. En altres models experimentals, s'ha observat com les formes dominants negatives d'algunes CDKs com la CDK1, 3, 4, 5 i 6, es mostraven útils per bloquejar la mort apoptòtica (Golsteyn, 2005).

Cal fer un petit incís per parlar dels inhibidors fisiològics de les CDKs com p21^{cip}, p27^{kip} i p16^{ink}. Aquestes proteïnes de petit tamany interaccionen amb els complexos CDK/ciclina i algunes d'elles són substrats de les caspases. Per exemple, en el model de les cèl·lules tumorals gàstriques induïdes a morir amb TGF- β 1, s'observa un augment de l'activitat CDK2 precedida de la degradació de p21 i p27. L'augment en l'activitat CDK2 desapareix quan s'inhibeixen les caspases. En aquest model, l'activació de les CDKs és dependent de l'activació de les caspases (Kim et al, 2001).

L'ús d'inhibidors farmacològics de CDKs ha aportat igualment evidències de la implicació de les CDKs en l'apoptosi. Molts d'aquests compostos com la roscovitina, l'isopropilpurina, etc... tenen estructures semblants a la de l'ATP i actuen antagonitzant aquesta molècula donadora de fosfats. Les dianes cel·lulars d'aquests compostos són múltiples i en molts casos encara no estan completament conegudes. Per aquest motiu cal ser caut en la interpretació dels resultats de l'ús d'aquests compostos. El tractament amb roscovitina o olomoucina redueix l'apoptosi en una línia cel·lular d'hepatoma humà tractada amb CD437, un retinoid sintètic que indueix la parada cel·lular en fase S per, seguidament, induir l'entrada en apoptosi (Hsu et al, 1999). En un model de cèl·lules neuronals corticals tractades amb el inhibidor del proteasoma lactacistina, el tractament en paral·lel amb el flavopiridol, protegia de l'apoptosi (Rideout et al, 2003). En paradigmes experimentals diferents, com el de cèl·lules leucèmiques, la roscovitina inhibeix l'apoptosi. Els fàrmacs inhibidors de CDKs han estat utilitzats en molts altres models per evitar l'apoptosi, per exemple en el de les cèl·lules d'hepatoma FaO o en la línia HUT78 (Golsteyn, 2005). Altres treballs han estat realitzats en models neuronals post-mitòtics. Per exemple, els treballs publicats per Park i els seus col·legues (1996) utilitzant com model les PC12 diferenciades amb NGF i cultius primaris de neurones simpàtiques. El flavopiridol o la olomoucina prevenen de la mort apoptòtica induïda per la pèrdua de factor tròfic i ho fan a les dosis inhibidores de proliferació. Paral·lelament, aquest mateix grup observa que les cèl·lules PC12 que no s'han diferenciat amb NGF moren quan són tractades amb els compostos inhibidors de CDKs. Padmanabhan i els seus col·legues (1999) publiquen els seus treballs realitzats en neurones granulars del cerebel, que eren induïdes a morir apoptòticament mitjançant concentracions despolaritzants de clorur de potassi. En aquest paradigma experimental el tractament amb flavopiridol, olomoucina o roscovitina protegia de l'apoptosi. Finalment, altres treballs han estat realitzats amb models timocitaris. Hakem i els seus col·legues (1999) publiquen els seus treballs realitzats sobre un model de timòcits post-mitòtics induïts a morir amb diferents estímuls pro-apoptòtics. Aquests estímuls de mort indueixen diversos fenòmens dependents de l'activació de CDK2 com l'estabilització

III – INTRODUCCIÓ

de p53, els canvis en la permeabilitat mitocondrial i l'activació de les caspases. L'ús de l'olomoucina o la roscovitina eviten l'apoptosi en aquests timòcits. Gil-Gómez i els seus col·legues (1998) utilitzen el model de timòcits no ciclants tractats amb dexametasona i γ -irradiació. En aquest paradigma experimental, els estímuls apoptòtics indueixen la degradació de p27 i, a continuació, l'augment de l'activitat de CDK2. S'observa també que, en aquest cas, l'activitat de la CDK2 no està associada ni a la ciclina E ni a la A, sinó a una proteïna sintetitzada "de novo". El cotractament amb roscovitina inhibeix la mort apoptòtica d'aquests timòcits.

A grans trets, els canvis en l'organització nuclear i l'augment en certs models de l'activitat CDK1 fan que l'apoptosi i la mitosi presentin homologies. Per aquest motiu, alguns grups han concebut a l'apoptosi com un fracàs mitòtic (*mitotic failure*), que no s'ha de confondre amb la catàstrofe mitòtica. La catàstrofe mitòtica és un tipus de mort que es produeix durant la mitosi i que pot presentar o no les característiques d'una mort apoptòtica.

Un punt clau per aclarir la implicació de les CDKs en l'apoptosi és conèixer els substrats que són fosforilats durant la mort apoptòtica. Konishi i els seus col·legues (2002) van identificar un d'aquests substrats en el seu paradigma experimental, que acabem de descriure. Aquest grup treballava sobre neurones granulars de cerebel de rata, que són cèl·lules postmitòtiques. Quan se les induïa a morir per apoptosi amb clorur potàssic, l'activitat CDK1 augmentava i la roscovitina bloquejava la inducció d'apoptosi. Els autors van examinar si hi havia canvis de l'estat de fosforilació de BAD, que és una proteïna *BH3 only*, en els aminoàcids potencialment fosforilables per les CDKs. Sorprenentment van trobar que la serina 128 (Ser¹²⁸) era fosforilada per CDK1 en les cèl·lules apoptòtiques i que aquest fet era important per la pèrdua d'interacció de BAD amb les proteïnes 14-3-3. Les proteïnes 14-3-3 actuen segregant la proteïna BAD no fosforilada en la Ser¹²⁸ al citoplasma i impedeixen que es dirigeixi al mitocondri. Els resultats d'aquests treballs van plantejar dubtes a la comunitat científica sobre el paper fisiològic de les CDKs a l'apoptosi ja que semblaria que la CDK1 podria ser expressada de nou en cèl·lules postmitòtiques, suggerint, una vegada més, que aquesta cinasa té un paper específic a l'apoptosi. És més, donat que en aquest paradigma experimental no es va examinar quina ciclina estava complexada amb la CDK1, es van generar varies preguntes sobre la seua identitat i sobre si BAD era també fosforilat durant la mitosi d'un cicle normal.

En alguns models de mort apoptòtica neuronal per dany o associada al desenvolupament, s'ha descrit l'activació de les CDKs. Quan es valora si hi ha hagut un augment en el nombre de cèl·lules, el resultat és negatiu i, a més, s'observa que les cèl·lules moren abans d'entrar en mitosi. Alguns grups han anomenat a aquest tipus de mort apoptòtica "entrada aberrant en el cicle cel·lular" però donat els anteriors punts, cal que s'examini si el cicle cel·lular està realment implicat o, si al contrari, es tracta

d'una apoptosi que utilitza maquinària enzimàtica comuna amb la del cicle cel·lular.

Sorprenentment, els fàrmacs inhibidors de CDKs poden induir apoptosi en alguns models cel·lulars i alguns d'ells estan sent assajats com agents antitumorals en assaigs clínics. La R-roscovitina, per exemple, es troba ja en fase II d'assaig clínic per la indicació anticancerosa.

LA CATÀSTROFE MITÒTICA

Inicialment, el terme de catàstrofe mitòtica estava restringit al fenotip letal d'un mutant de *Schizosaccharomyces pombe* sensible a la temperatura i amb greus anormalitats en la segregació dels cromosomes. Posteriorment, alguns autors van observar un fenomen semblant en cèl·lules de mamífer que havien sofert danys a l'ADN i que no podien completar d'una forma normal la mitosi produint-se canvis en la ploïdia i, a la llarga, fenòmens d'aneuploidització. És per aquesta raó que també se l'ha anomenada "error mitòtic". Els canvis de la ploïdia cel·lular desencadenen un dany extensiu de l'ADN i una activació constant dels sistemes de reparació que veuen excedides les seues capacitats tamponadores de lesions del material genètic. Finalment, és molt probable que s'acabin seleccionant un grup de cèl·lules resistents a l'apoptosi que sobreviuran a les endoduplicacions i podran originar un tumor (Ivanov et al. 2003).

Com ja acabem d'esmentar, el terme "catàstrofe mitòtica" s'ha fet extensiu en els darrers anys a un tipus de mort en cèl·lules de mamífer. Fins ara, no existeix una definició àmpliament acceptada de catàstrofe mitòtica. Igor Roninson et al. (2001) van intentar definir-la des d'un punt de vista morfològic. En concret, com el tipus de mort cel·lular resultant d'una mitosi anormal i que, normalment, desembocava en la formació de grans cèl·lules amb múltiples micronuclis i cromatina no condensada. Ara bé, altres treballs publicats, mostraven que en alguns casos les cèl·lules que entraven en catàstrofe mitòtica presentaven alhora característiques morfològiques de l'apoptosi (per exemple la presència d'agregats de cromatina). Aquest tipus d'evidències contradictòries fan que fins ara no s'hagi arribat a un consens sobre les característiques morfològiques distintives de la catàstrofe mitòtica, notòriament en quant a aspectes com el grau de condensació de la cromatina. Quant a la possible relació entre la catàstrofe mitòtica i l'apoptosi, en alguns paradigmes experimentals, la sobreexpressió de membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 o també la inhibició general de les caspases, no frenava la mort per catàstrofe mitòtica. Aquests resultats evidenciaven que la catàstrofe mitòtica era un tipus de mort diferent de l'apoptosi (Nabha et al., 2002; Roninson et al., 2001). Altres grups de recerca han suggerit que la catàstrofe mitòtica hauria d'ésser contemplada com una mitosi anormal que es resol en forma d'un procés de mort

(a través de mecanismes apoptòtics o necròtics) i no com un tipus de mort cel·lular en sí mateixa (Chu et al., 2004; Nitta et al., 2004). Per contra, Castedo et al. (2004) han proposat recentment una definició funcional de la catàstrofe mitòtica i defenen que el desmantellament cel·lular es produeix per apoptosi.

Segons Castedo et al. (2004), la catàstrofe mitòtica és un tipus de mort cel·lular que es presenta durant la mitosi o com a resultat d'un intent fallit de completar aquesta fase del cicle (Castedo et al., 2004). Es produeix per la suma dels efectes de determinats tipus de danys, com per exemple els dels taxans, sumats a la disfunció dels mecanismes de *checkpoint* de G2/M. Està controlada per nombroses proteïnes tractades al llarg d'aquesta tesi, entre les quals destaquem algunes cinases (com per exemple la CDK1, les cinases polo-like i les cinases Aurora), les proteïnes dels *checkpoints*, la survivina, p53, les CASPs i els membres de la família de Bcl-2.

Algunes de les característiques de la catàstrofe mitòtica observades en el paradigma experimental de Castedo et al. (2004) són:

- Condensació de la cromatina
- Alliberament mitocondrial de proteïnes pro-apoptòtiques
- Activació de les caspases
- Degradació de l'ADN

Aquestes característiques són àmpliament compartides per la mort apoptòtica. En alguns paradigmes experimentals, la transfecció d'inhibidors de MMP (Bcl-X_L, v-MIA, Bcl-2) o, simplement, el *knock-out* de Bax, protegeixen de la catàstrofe mitòtica (Green i Kroemer, 1998). És més, la inhibició de l'expressió de Bcl-2 amb oligonucleòtids anti-sentit pot facilitar i amplificar la catàstrofe mitòtica (Elez et al., 2003). Aquests fets donen suport a la importància de la maquinària apoptòtica (especialment la maquinària de la via intrínseca) per l'execució de la catàstrofe mitòtica.

Si la catàstrofe mitòtica es caracteritza per MMP i la presència d'activitat caspasa, una de les qüestions principals és desvelar quins són els mecanismes moleculars que relacionen una mitosi anormal i l'apoptosi. Castedo i els seus col·legues (2004) proposen que la resposta probablement varia en funció del tipus de catàstrofe mitòtica. En el cas de la catàstrofe mitòtica dependent de p53, existeixen evidències prou sòlides que suggereixen que la mort apoptòtica és conseqüència de la transcripció de determinades proteïnes pro-apoptòtiques via p53. Per exemple, en els models de mort durant la profase per fusió de cèl·lules asincròniques, l'augment de proteïnes com Puma, Bax són determinants en la inducció d'apoptosi (Roumier et al., 2003). En el cas de la catàstrofe mitòtica que es produeix durant la metafase i de manera independent de p53, la CASP2 semblaria activar-se en un moment anterior a la MMP. L'ordre

d'esdeveniments apoptòtics en aquests casos seria el següent : $CASP2 \rightarrow MMP \rightarrow CASP3$ (Castedo et al., 2004). La explicació de com s'activa la CASP2 en aquestos sistemes és una incògnita. Es sap que la procaspasa2 pot ser activada al nucli sota determinats danys a l'ADN (Lassus et al., 2002; Paroni et al., 2002; Read et al., 2002; Robertson et al., 2002). D'altra banda, s'ha descrit que la CASP2 pot induir la MMP en mitocondris aïllats, encara que es desconeix la seua diana mitocondrial (Guo et al., 2002).

P53, “LE GARDIEN DU GENOME ”

Le suppresseur de tumeurs p53 est le responsable de l’intégration de multiples signaux de stress qui aboutiront dans plusieurs réponses anti-prolifératives telles que l’arrêt du cycle, la différenciation, la sénescence cellulaire ou l’induction de l’apoptose (Vousden and Lu, 2002). Parmi celles-ci, l’induction de l’apoptose constitue une des plus importantes fonctions de p53. De nombreuses données montrent que l’activation de p53 se traduit par l’arrêt du cycle cellulaire dans des cellules normales tandis que, dans des cellules transformées, son activation aboutit préférentiellement au déclenchement de la réponse apoptotique (pour une revue, Ko and Prives, 1996). La perturbation de l’activation de p53 peut favoriser d’une part, la progression tumorale et, d’autre part, la chimiorésistance (Fridman and Lowe, 2003). Pour bien assurer l’efficacité du programme apoptotique, p53 peut agir soit comme un facteur de transcription ou soit, par des mécanismes indépendants de la transcription (Schuler and Green, 2001 ; Vousden and Lu, 2002). D’autres membres de la famille de p53 (p63 et p73) peuvent également induire l’apoptose d’une façon concertée ou parallèle à celle de p53. L’étude des mécanismes d’action de p53 offre la possibilité d’insérer l’apoptose dans un réseau complexe de suppresseurs tumoraux contrôlés par différents signaux, des facteurs environnementaux et par le type cellulaire. L’étude détaillée de ce réseau peut aider à la compréhension des mécanismes pathologiques et, par conséquent à l’amélioration des traitements thérapeutiques (Fridman and Lowe, 2003).

Les suppresseurs de tumeurs agissent en maintenant l’homéostasie des tissus, c’est à dire, en contrôlant le nombre et le comportement des cellules d’un tissu spécifique (Hussain and Harris, 1998). P53 est activé en réponse aux dommages de l’ADN et à plusieurs signaux de stress tels que la hypoxie ou la présence d’oncogènes activés. En fait, p53 agit comme un effecteur dans les voies de signalisation déclenchées par les *checkpoints* du cycle cellulaire. En conséquence, la disruption de la voie dépendante de p53 peut induire des erreurs aux niveaux des *checkpoints*, l’immortalisation cellulaire, l’instabilité génomique et la survie des cellules endommagées. Ces événements vont provoquer l’apparition d’une population de cellules anormales mais actives au niveau prolifératif. En résumé, ces observations montrent l’importance d’une régulation précise de p53. L’inactivation de p53 offre des avantages aux cellules

tumorales. En revanche, l'activation excessive de p53 est aussi délétère et peut induire l'apparition de pathologies comme l'arthrite, la sclérose multiple, certaines neuropathies, et augmenter le dommage ischémique (Wosik et al, 2001).

Le gène de p53 est localisé dans le bras court du chromosome 17 et il est constitué de 11 exons. Le gène de p53 encode pour une protéine de 393 aa avec 3 domaines fonctionnels:

1. Le domaine amino-terminal qui est chargé de l'activation transcriptionnelle (TAD).
2. Le domaine central avec la région de liaison à l'ADN (DBD) spécifique de séquence. Cette région est la plus conservée de la protéine.
3. Le domaine carboxi-terminal constitué d'une région flexible, d'une région d'oligomérisation (OD) et d'une extrémité basique.

La protéine p53 s'exprime d'une façon ubiquitaire dans tous les tissus. En conditions physiologiques les niveaux de protéine sont bas ou même indétectables. La protéine p53 inactive a une localisation diffuse dans la cellule mais lors de son activation, les niveaux de protéine augmentent par stabilisation et p53 migre dans le noyau ou/et dans la mitochondrie.

6.1 MECANISMES D'ACTIVATION DE P53

6.1.1 L'oncoprotéine MDM2

MDM2 fut décrit comme un gène amplifié dans les chromosomes murins *double minute* de la lignée fibroblastique 3T3 (Cahilly-Snyder et al, 1987). L'analyse génétique a mis en évidence que MDM2 (qui reçoit le nom de HDM2 chez l'homme) est surexprimé dans 5-10% des tumeurs humaines (Momand et al., 1998). Les embryons sans MDM2 meurent "in utero" mais cette toxicité disparaît dans un fond génétique déficient en p53 en suggérant qu'une des fonctions de MDM2 est de réguler l'activité de p53 (Montes de Oca Luna et al., 1995 ; Jones et al, 1995). La capacité oncogénique de MDM2 est partiellement conférée par sa liaison à p53, conduisant à son inhibition. Les effets de la surexpression de MDM2 sont l'instabilité des chromosomes, la duplication des centrosomes et des changements dans la ploïdie. Ces effets sont semblables à ceux obtenus par des mutations inhibitrices de p53 (Carrol et al., 1999).

MDM2 est régulée positivement par la voie Ras et négativement par la phosphorylation dépendante d'ATM ou l'union directe de p14ARF. En plus, MDM2 s'associe de façon directe à plusieurs protéines comme Rb, E2F1, Numb, MTBP, p73 et la protéine ribosomale L5 (Momand et al., 2000 ; Daujat et al.,

2001). MDM2 est une cible transcriptionnelle directe de p53 et son expression déclenche une boucle de rétro-action négative capable d'arrêter la réponse dépendante de p53 (Wu et al., 1993).

En état non stressé, la cellule maintient des niveaux bas de p53 grâce à la boucle de régulation négative réalisée par MDM2. Cette protéine lie p53 par son extrémité amino terminale et règle les niveaux de la protéine par différents mécanismes :

1. MDM2 lie le domaine d'activation transcriptionnelle de p53, bloque son activité transcriptionnelle, inhibe l'acétylation de p53 et interfère avec la transactivation par p300/CBP (Kobet et al., 2000 ; Ito et al., 2001).
2. MDM2 participe à l'export nucléaire de p53.
3. MDM2 est une ubiquitine ligase de type *Ring finger* qui cible p53 pour son ubiquitination et sa dégradation par la voie du protéasome (Stommel et al., 1999).

6.1.2 Les modifications post-traductionnelles

L'activation de p53 par des stimuli stressants peut impliquer plusieurs modifications post-traductionnelles de p53 sur plusieurs résidus par phosphorylation, sumo-ylation ou acétylation (Vogelstein et al., 2000 ; Brooks and Gu, 2003). La protéine MDM2 peut être aussi modifiée post-traductionnellement. Quelques modifications de MDM2 aboutiront à l'auto ubiquitination de MDM2 et sa dégradation (Stommel and Wahl, 2004).

La modification post-traductionnelle de p53 la plus largement étudiée est la phosphorylation. Elle joue un rôle décisif dans la stabilisation et l'activation de ce suppresseur de tumeurs. Plusieurs résidus de sérine (6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, 315, 371, 376, 378, 392) et trois résidus de thréonine (18, 55, 81) ont été identifiés comme sites de phosphorylation en réponse au stress. Plusieurs kinases de sérine ou thréonine ont été impliquées dans la voie de signalisation en amont de la phosphorylation de p53 (ATM, ATR, DNA-PK, Chk1, Chk2, CK1, p38, CDK2, PKC, JNK). Récemment on a décrit que p53 peut également être phosphorylé par CDK5 de façon à augmenter son activité transcriptionnelle (Zhang et al, 2002).

Les phosphorylations de p53 peuvent induire l'activation du facteur de transcription par différents mécanismes :

1. La diminution de l'affinité entre MDM2 et p53. Par exemple, les résidus Ser²⁰ et Thr¹⁸ du domaine amino terminal de p53 jouent un rôle essentiel dans l'interaction de MDM2 et p53. La phosphorylation de ces résidus en situation de stress pourrait être la responsable de la diminution de l'affinité entre p53 et MDM2 (Craig et al, 1999).

2. La modification de l'activité transcriptionnelle de p53. Des données suggèrent que la phosphorylation spécifique sur certains sites de p53 peut modifier l'activité transcriptionnelle du gène et/ou la sélectivité pour différents groupes de gènes. Cette phosphorylation différentielle serait à l'origine des différentes réponses cellulaires au stress (Brooks and Gu, 2003 ; Jimenez et al., 1999). Par exemple, quelques groupes ont décrit que la phosphorylation de la Ser³¹⁵ et de la Ser³⁹² réguleraient l'oligomérisation de p53 et son union spécifique à l'ADN (Wang and Prives, 1995 ; Hao et al., 1996 ; Sakaguchi et al., 1997). Pour jouer son rôle comme activateur de la transcription, p53 forme des complexes avec des autres régulateurs transcriptionnels parmi lesquels se trouvent quelques acétyl transférases comme p300/CBP. Par cette interaction, les histones entourant le site de liaison à l'ADN de p53, sont acétylées, ce qui permet l'accès de la machinerie de transcription à l'ADN (Espinosa et Emerson, 2001). On a montré que la phosphorylation de la Ser¹⁵ augmente l'interaction de p53 avec ses co-activateurs transcriptionnels CBP et PCAF (Sakaguchi et al., 1997 ; Lambert et al., 1998). La phosphorylation de la Ser⁴⁶ en situation de stress a été impliquée dans l'activation de la réponse apoptotique dépendante de p53 (D'Orazi et al., 2002 ; Saito et al. 2002). Récemment on a mis en évidence que Pin1, l'isomérase de propyl, se lie à p53 et stimule sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle. Cette liaison est dépendante de la phosphorylation de p53 suite aux dommages de l'ADN (Zheng et al., 2002 ; Zacchi et al., 2002). En conclusion, ces observations suggèrent que la phosphorylation de p53 aurait un rôle non seulement dans sa stabilisation mais aussi dans la modulation de son activité transcriptionnelle.

En revanche, d'autres travaux appuient l'hypothèse contraire en mettant en évidence que la phosphorylation de p53 n'est pas nécessaire pour la stabilisation ni pour l'activité transcriptionnelle de la protéine. Des p53 mutés dans plusieurs sites de phosphorylation et exprimés transitoirement, étaient toujours actifs dans des essais d'activité luciférase et, de plus, la transfection de ces formes mutés de p53 dans des lignées déficientes pour le gène de p53 ou bien sauvages, permettait toujours la stabilisation de p53 en réponse au stress de l'ADN (Ashcroft et al., 1999). Des travaux réalisés avec des souris mutantes qui portaient des p53 avec des substitutions dans la Ser¹⁵ ou Ser²⁰, suggèrent que ces résidus ne sont essentiels pour l'activation de p53 (Wu et al., 2002 ; Chao et al., 2003 ; Sluss et al., 2004). Plus récemment, des études réalisées avec la nutline-3, un antagoniste de MDM2, ont mis aussi en évidence que la phosphorylation ne serait nécessaire pour l'activation de p53 (Thompson et al., 2004).

Finalement, on doit considérer que p53 peut aussi agir comme un répresseur de la transcription. La manière dont p53 réprime la transcription n'est pas bien connue. Il pourrait impliquer la capacité de p53 à recruter les déacétylases d'histones sur certains gènes avec la collaboration du corépresseur mSin3a (Murphy et al, 1999). De façon intéressante, le gène de la Survivine est régulé négativement par p53

(Ambrosini et al, 1997). Les mutations inhibitrices de p53 pourraient contribuer à la surexpression de la Survivine observée dans plusieurs tumeurs humaines (Hoffman et al., 2002).

6.2 P53 ET APOPTOSE.

L'implication de p53 dans l'apoptose repose sur plusieurs observations. Tout d'abord, chez des souris p53 *-/-*, la diminution de l'apoptose est en corrélation avec la progression de la tumeur (Symons et al., 1994; Parant and Lozano, 2003). P53 n'a pas seulement un rôle dans la suppression des tumeurs mais aussi dans la mort induite par la chimiothérapie. L'activité anti-néoplasique de p53 repose principalement sur l'induction d'apoptose (Schmitt et al., 2002). En fait, la perte de p53 peut être liée à l'apparition de chimiorésistance dans certains types cellulaires (Wallace-Brodeur and Lowe, 1999).

P53 est capable d'induire l'apoptose par des mécanismes transcriptionnels ou indépendants de la transcription. Les mécanismes transcriptionnels comprennent tant l'activation que la répression de certains gènes. Les souris *knock-in*¹ avec un p53 transcriptionnellement inactif mais capable de lier l'ADN présentent des défauts d'apoptose (Jimenez et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les effets transcriptionnels de p53 sont ceux les plus couramment impliqués dans l'apoptose des cellules normales.

Les gènes inductibles par p53 comprennent des gènes de la voie apoptotique mitochondriale et de la voie des récepteurs de mort. Cependant, c'est la voie mitochondriale qui a été le plus largement impliquée dans l'induction d'apoptose dépendante de p53. P53 peut également déclencher l'expression de gènes qui inhibent les voies de survie, l'exemple le plus clair est PTEN, une phosphatase inhibitrice de la voie PKB/Akt. Cette diversité de mécanismes entraînant la mort apoptique assureraient l'activité de p53 comme suppresseur de tumeurs (Vousden et Lu, 2002).

Les effets transcriptionnels de p53 sur l'apoptose peuvent être classés sur base de la voie apoptotique engagée :

1. Contrôle transcriptionnel de la voie intrinsèque.

La plupart des travaux réalisés indiquent que l'apoptose induite par p53 se déroule par la voie intrinsèque (Soengas et al., 1999 ; Schuler et al., 2000). Plusieurs membres de la famille de Bcl-2 sont régulés transcriptionnellement par p53 : parmi eux Bax (Miyashita et al, 2000), et quelques *BH3 only* comme Puma (Nakano and Vousden, 2001), Noxa (Oda et al., 2000) et Bid (Sax et al., 2002). La surexpression de ces protéines provoque une augmentation du taux de protéines pro-apoptotiques par rapport aux

¹Une souris knock-in est celle qui a été soumise à une modification spécifique et ciblée d'un de ses gènes.

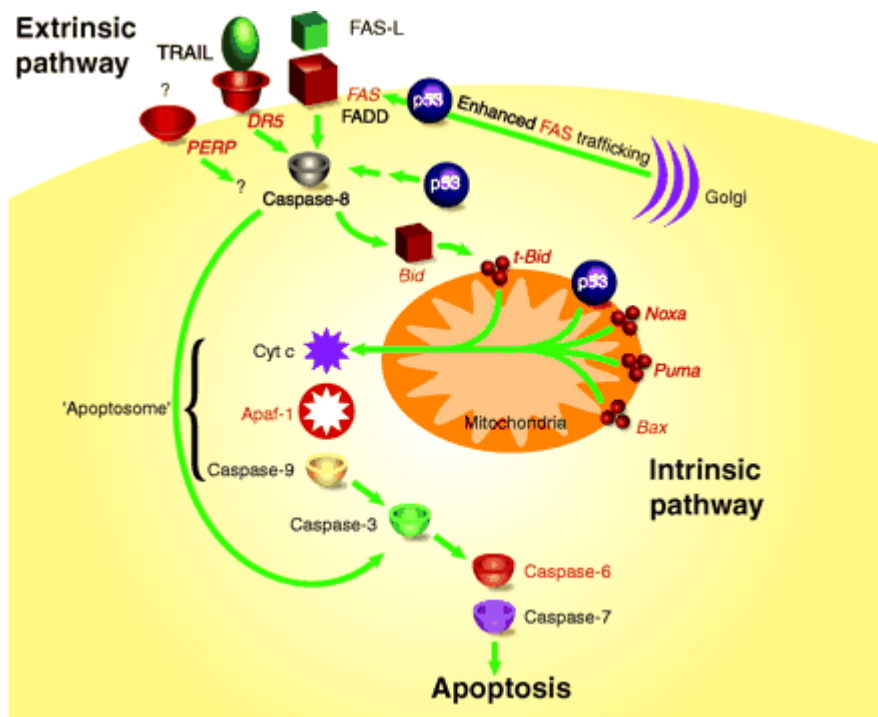


Figura 6.1. P53 dans la régulation de l'apoptose. Sur la figure on a représenté les différents points où p53 peut agir en modulant l'apoptose par les deux voies classiques: la voie extrinsèque ou des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou mitochondrial.

anti-apoptotiques et par la suite favorise la sortie des protéines pro-apoptotiques mitochondriales, l'activation des caspases et l'apoptose. P53 peut aussi agir en aval de la mitochondrie étant donné qu'il est capable de contrôler l'expression de Apaf-1 (Kannan et al., 2001 ; Moroni et al., 2001 ; Robles et al., 2001) et de la CASP6 (MacLachlan et al., 2002). Possiblement, ce dernier point de contrôle n'est pas crucial pour l'initiation de l'apoptose mais sensibilise les cellules à ce type de mort (Juin et al., 2002).

2. Contrôle transcriptionnel de la voie extrinsèque.

P53 induit des changements dans les concentrations de protéines impliquées dans la voie extrinsèque. Cependant, la contribution de la voie extrinsèque dans l'apoptose dépendante de p53 n'est pas encore bien évaluée. Quelques protéines de la voie extrinsèque avec des éléments de réponse à p53 sont : Fas/CD95 (Owen-Schaub et al., 1995), DR5 (Wu et al., 1997) et TNFSF6 (Maecker et al., 2000). Comme on a déjà écrit au préalable, p53 est aussi capable d'augmenter les niveaux de Bid en permettant la connexion entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Sax et al., 2002).

6.3 P53 CHEZ LE NEUROBLASTOME

P53 est le suppresseur de tumeurs le plus fréquemment muté parmi un large spectre de cancers humains (Hollstein et al., 1991 ; Levine et al., 1991) avec une fréquence de mutation allant jusqu'à 50% (Caron de Fromental and Soussi, 1992). A contrario, les neuroblastomes font partie du petit groupe de tumeurs dans lesquelles on n'observe pas de mutations dans le gène p53 mais pour lesquelles la surexpression de cette protéine est l'un des changements les plus fréquents (Davidoff et al., 1992; Vogan et al., 1993). Toutefois on a observé que la plupart des neuroblastomes non différenciés présentent un p53 séquestré dans le cytoplasme (Moll et al., 1995). L'accumulation de p53 dans le cytoplasme a été aussi observé dans des carcinomes inflammatoires du sein et en même temps on a détecté la présence de p53 dans le cytoplasme des cellules non tumorales de la glande mammaire pendant la lactation et dans des cellules embryonnaires humaines (Moll et al., 1992; Aladjem et al., 1998). La protéine MDM2 induit la dégradation cytoplasmique de p53 par la voie du protéasome et elle est le régulateur principal dans le maintien des bas niveaux de p53 dans les cellules non stressées. Zaika et al. (1999) ont mis en évidence que la surexpression de MDM2 dans des neuroblastomes ne suffit pas à décroître les niveaux de p53 et que la forte accumulation de p53 peut être attribuée à une résistance de l'oncogène à la dégradation dépendante de MDM2. Les évidences dans son modèle suggèrent que cette résistance est due à une modification covalente de p53. Alternativement, l'accumulation cytoplasmique de p53 pourrait s'expliquer par un intensif export nucléaire dépendant de MDM2. Ainsi, on a observé que l'inhibition de l'expression ou de la fonction de MDM2 dans des cellules de neuroblastome induit la redistribution du p53 fonctionnel au noyau (Lu et al., 2000). Récemment, l'identification par Nikolaev et ses collègues (2003) de la protéine Parc (*p53 associated parkin like cytoplasmatic protein*) a ajouté un degré de complexité à cette régulation. Parc est une protéine d'un poids moléculaire élevé (270 KDa) qui s'exprime de manière ubiquitaire et qui est maintenue dans des méga-complexes au niveau du cytoplasme (1MDa). Parc contient un domaine *Ring-IBR-Ring* et présente une activité ubiquitine ligase. Cependant, jusqu'à présent, aucune évidence ne permet de conclure à une régulation par cette activité de la stabilité de p53. Parc lie p53 au niveau du cytoplasme et bloque son transport au noyau. Curieusement, on a constaté que quelques neuroblastomes surexprimaient Parc et en même temps, que la réduction des niveaux de Parc par ARN d'interférence (RNAi) rendait les cellules de neuroblastome plus sensibles lors de traitements de la chimiothérapie (Nikolaev et al., 2003). Dans une revue, Kastan et Zambetti proposent que l'accumulation de p53 dépend non seulement des taux d'exportation nucléaire (réalisé par MDM2) mais aussi des taux de rétention cytoplasmique (effectué par Parc).

6.4 P53 ET SA FAMILLE

P53 appartient à une famille de facteurs de transcription formé par deux autres membres : p63 et p73. Malgré l'homologie de séquences de toutes les protéines de la famille, leurs fonctions et régulation sont différentes. Le gène de p53, placé sur le bras court du chromosome 17, a 11 exons alors que p63 et p73 en ont 15 et 14 respectivement. De plus, les signaux activateurs de p53 sont différents de ceux qui activent p63 et p73. Seulement une petite quantité des signaux qui induisent p53 peuvent aussi induire p73 et cette expression peut conduire à une chute des niveaux de p53 par l'augmentation des niveaux de MDM2 (Wang et al., 2001).

La protéine p73, comme p53, présente un domaine de transactivation (TAD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'oligomérisation (OD) (Kaghad et al., 1997). p73 peut présenter une activité p53-like dans plusieurs situations et activer la transcription de gènes tels que p21, MDM2 ou BAX, menant la cellule à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle (Jost et al., 1997). Contrairement à p53, le gène de p73 encode plusieurs isoformes de la protéine obtenues par l'utilisation de promoteurs alternatifs de l'extrémité 5' ou par épissage alternatif de l'extrémité 3' (Yang et al., 2002; Stiewe and Pützer, 2002). L'utilisation de promoteurs situés 1) en amont de l'exon 1 et 2) dans l'intron 3, détermine l'apparition de l'isoforme complète (TAp73 α) et de l'isoforme tronquée au domaine amino terminal, *TAD lacking isoform* (Δ Np73) respectivement. L'isoforme TAp73 pourrait être cruciale pendant la neurogenèse de certaines structures et la différenciation neuronale chez les souris (De Laurenzi et al., 2000), tandis que Δ Np73 joue un rôle anti-apoptotique essentiel "in vivo" (Pozniak et al., 2000). L'isoforme Δ Np73 de p73 est exprimée abondamment pendant le processus de développement des neurones où elle agirait comme un inhibiteur de la fonction apoptotique de p53. Δ Np73 peut interagir physiquement avec TAp73 α , TAp73 β , et p53 de façon à inhiber leurs activités transactivatrices en amont des gènes MDM2, Bax ou Δ Np73 dans des cellules SAOS (Nakagawa et al., 2003). La surexpression de Δ Np73 chez les SH-SY5Y induit la survie cellulaire en entrant en compétition avec p53 et TAp73. En résumé, Nakagawara et ses collègues proposent l'existence d'une boucle de rétroaction négative de TAp73 par Δ Np73, l'une de ses cibles. Cette boucle de régulation agit comme un système d'autorégulation qui sert à moduler la vie et la mort cellulaire et qui pourrait agir chez les cellules de neuroblastome.

6.5 EFFETS DES INHIBITEURS DE CDKs SUR P53

L'induction d'apoptose suite à l'inhibition des CDKs est indépendante de p53 (Shibata et al., 1996). Cependant, l'olomoucine et la roscovitine, parmi quelques autres composés avec activité inhibitrice de CDKs, présentent des effets stabilisateurs sur la protéine p53. La roscovitine induisait l'accumulation

de p53 sauvage au noyau et la déstructuration des nucléoles des cellules tumorales en interphase. Cette réponse était complètement réversible à la suite du retrait de la drogue après 4 heures de traitement et s'accompagnait d'une restauration de l'organisation nucléolaire, une augmentation des niveaux de p21, une diminution du p53 sauvage et une reprise du cycle cellulaire normal (David-Pfeuty et al., 2001). Ljungman and Paulsen (2001) ont montré que le traitement à la roscovitine induisait une diminution de la transcription. Ces auteurs ont suggéré que les effets inhibiteurs de la roscovitine sur la transcription étaient probablement les responsables de l'accumulation de p53. Ce même groupe a montré que l'accumulation de p53 dans le noyau des cellules traitées avec la roscovitine n'était pas précédée par des modifications sur la Ser¹⁵ ou Lys³⁸² de p53. Lu et al. (2001) ont observé la stabilisation de p53 en réponse au traitement avec l'olomoucine ou la roscovitine. Quand les cellules sont traitées à la roscovitine, le mécanisme principal de cette stabilisation serait la diminution de MDM2 au niveau transcriptionnel.

AUTRES COMPOSES ANTITUMORAUX.

7.1 LES NUTLINES

La surexpression de MDM2 dans plusieurs tumeurs affaiblit la fonction de p53. L'inhibition de la liaison entre MDM2 et p53 est donc une stratégie thérapeutique envisageable pour restituer la fonction de p53 dans les cellules tumorales. Des études récentes ont démontré que la disruption de l'interaction MDM2-p53 par plusieurs mécanismes moléculaires ou par la suppression de l'expression de MDM2, peut induire l'activation de p53 et l'inhibition de la croissance de la tumeur (Chen et al., 1998; Wasylyk et al., 1999). Vassilev et ses collègues (2004) ont décrit pour la première fois la nutline, une petite molécule inhibitrice de la liaison entre MDM2 et p53. La nutline présente une activité anti-tumorale tant "in vivo" comme "in vitro" .

Historiquement, la synthèse d'inhibiteurs de l'interaction des protéines non enzymatiques a présenté une grande difficulté. Néanmoins, la résolution de la structure cristalline de MDM2 lié à un peptide du domaine de transactivation de p53 (Kussie et al., 1996) a été d'une grande utilité pour se rendre compte que MDM2 présente un site de liaison relativement profond et hydrophobique. Cette caractéristique est favorable pour la synthèse de petites molécules capables de bloquer l'interaction MDM2 et p53. Vassilev et ses collègues ont criblé plusieurs collections de composés synthétiques en regardant les effets sur la liaison MDM2-p53. Les composés actifs capables d'inhiber l'interaction ont été classés selon leur structure. Ainsi on a obtenu une structure commune à partir de laquelle on a synthétisé des nouveaux composés améliorés en puissance et en sélectivité. Parmi ces composés on a remarqué l'activité d'une série d'analogues des cis-imidazolines qui ont reçu le nom de nutlines (pour Nutley, une ville de l'état de New Jersey où se trouve l'unité de prescription des drogues Hoffman-La Roche de *Roche*). Ces imidazolines déplacent la forme recombinante de p53 complexée à MDM2 avec des valeurs moyennes d'inhibition dans la gamme de 100 jusqu'à 300 nM. Ces nutlines sont synthétisées sous forme de mixture racémique. Les énantiomères des différentes nutlines peuvent être séparés au moyen de colonnes chirales ; par exemple, la nutline-3 dont on dispose de deux énantiomères "a" et "b" (Fig X). L'énantiomère

“a” présente une puissance de liaison à MDM2 150 fois supérieure à celle de l'énantiomère “b” (Vassilev et al., 2004). La détermination de la structure cristallographique de MDM2 liée à la nutline-2 a fourni des informations sur la manière dont l'inhibiteur se lie à la protéine : l'inhibiteur cherche à reproduire la liaison de p53 à MDM2.

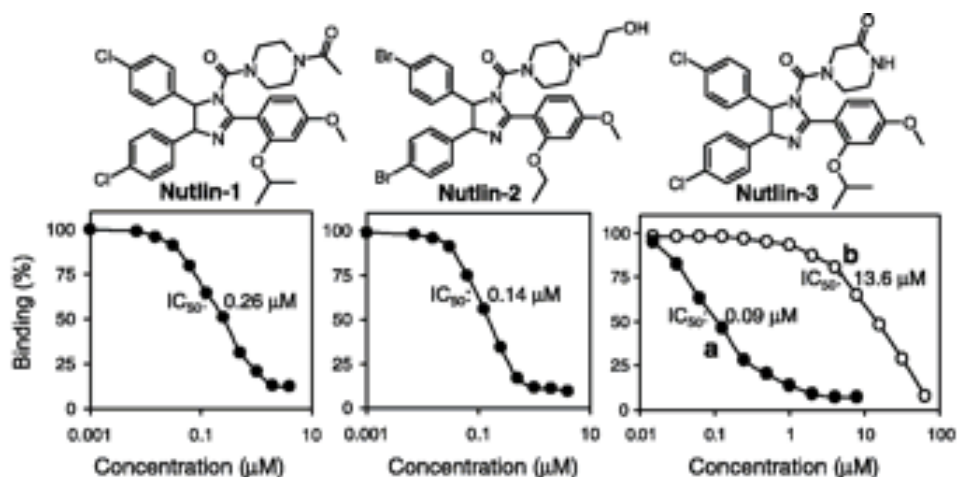


Figura 7.1. Structure de la famille des nutlines. Courbes dose-réponse de la liaison MDM2-p53 “in vitro” La nutline-1 et la nutline-2 ont été utilisées sous forme racémique alors que pour la nutline-3 les deux énantiomères (a et b) ont été testés séparément (Vassilev et al., 2004).

Quant aux effets moléculaires, le traitement des cellules avec un inhibiteur de la liaison MDM2-p53 pourrait induire :

1. La stabilisation et l'accumulation de p53 en même temps qu'un blocage de l'export nucléaire et de la dégradation de la protéine.
2. L'activation de l'expression de MDM2.
3. L'activation des autres gènes régulés par p53 ainsi que de la voie dépendante de p53.

Ces faits pourraient se traduire à niveau cellulaire par un arrêt du cycle en phase G1 et G2 et/ou apoptose.

Vassilev et collègues ont essayé les analogues des imidazoles dans plusieurs lignées cancéreuses avec un p53 fonctionnel par rapport à d'autres ayant un p53 inactivé. Les résultats ont mis en évidence que, uniquement dans le cas des lignées avec un p53 fonctionnel on pouvait constater l'activation de la voie p53 en réponse au traitement avec la nutline-1. L'accumulation de p53 dans ces modèles est responsable de l'augmentation de p21 et de MDM2, de la diminution de la viabilité et de l'arrêt en G1 et G2/M. En même temps, ils ont montré que l'augmentation de p53 se produisait par une voie indépendante de la

transcription et ils ont conclu qu'il s'agissait d'une stabilisation grâce à la liaison de la nutline. Les essais de l'activité antitumorale de la nutline-3 "in vivo" réalisés avec des souris nus, caractérisés par ne pas présenter de rejet immunitaire, ont montré une diminution de la croissance des xénogreffes des tumeurs humaines.

7.2 LES TOXIQUES DES MICROTUBULES.

Les drogues qui ciblent les microtubules se trouvent parmi les thérapies anticancéreuses le plus couramment prescrites. Les microtubules sont les pièces fondamentales du cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes. Ce sont des polymères protéiques longs, filamenteux et d'une forme tubulaire. Ils jouent un rôle fondamental dans le développement et le maintien de la forme cellulaire, dans le transport des vésicules, des mitochondries et d'autres éléments de la cellule et, également, dans la signalisation cellulaire, la division cellulaire et la mitose.

Les microtubules sont des hétérodimères formés de sous unités α et β de la tubuline. Les cellules humaines possèdent 6 et 7 isoformes de sous unités α et β , respectivement. Les dimensions de ces hétérodimères sont 4 nm x 5 nm x 8 nm et 100 000 Daltons en masse et constituent des microtubules d'apparence filamenteuse qui peuvent atteindre une longueur de plusieurs micromètres. Les microtubules sont des polymères avec une grande activité dynamique et un contrôle stringent de la dynamique de sa polymérisation à travers le temps et l'espace. La diversité fonctionnelle des microtubules se produit grâce à :

1. L'union à la tubuline soluble et aux surfaces et extrémités des microtubules, de plusieurs protéines régulatrices parmi lesquelles on trouve les protéines associées aux microtubules (MAPs pour *Microtubule Associated Proteins*). Plusieurs MAPs ont été décrites parmi lesquelles on trouve des protéines motrices comme la dynéine et la quinésine et des autres protéines impliquées dans plusieurs rôles comme la survivine (Giodini A et al., 2002), la stathmine, etc. Certaines de ces protéines sont surexprimées dans des cellules cancéreuses et les autres sont responsables de l'apparition de résistances au traitement avec certaines drogues chimiothérapeutiques qui agissent sur les microtubules.
2. L'expression de plusieurs isotypes de tubuline avec des fonctions bien différenciées. Par exemple, chez l'homme existent 6 formes de α -tubuline et 7 de β -tubuline qui sont exprimées à différents niveaux dans différents types cellulaires et tissulaires.
3. Les modifications post-traductionnelles de la tubuline, par exemple: la polyglycylation, la polyglu-

tamiliation, la phosphorylation, l'acétylation, la détyronisation/tyronisation, et aussi l'enlèvement de l'avant dernier résidu d'acide glutamique de l' α -tubuline.

La polymérisation des microtubules se produit grâce à des mécanismes de nucléation-élongation. La formation d'un "noyau" de microtubules est suivie d'une rapide élongation du microtubule par l'addition réversible et non-covalente de dimères de tubuline à ses extrémités. La dynamique des microtubules profite de l'énergie de l'hydrolyse du GTP au moment de l'union de la tubuline-GTP à l'extrémité du microtubule. Cette dynamique est essentielle aux mouvements corrects des chromosomes et à leur ségrégation dans les cellules filles. Tenant compte de ce rôle prépondérant de la dynamique des microtubules sur la ségrégation des chromatides sœurs, il est évident que des molécules agissant sur les microtubules sont des candidats de choix pour inhiber la mitose.

La mitose est un processus rapide dans la plupart des types cellulaires. Cette rapidité est particulièrement marquée au niveau du fuseau mitotique au sein duquel une dynamique microtubulaire élevée est requise, dans un premier temps, pour l'attachement des chromosomes aux kinétochores et au fuseau pendant la prométaphase après la rupture de l'enveloppe nucléaire; ensuite, pour l'alignement des chromosomes à la plaque métaphasique et finalement pour la séparation synchrone des chromosomes en anaphase et télophase. La présence d'un seul chromosome non attaché au fuseau est suffisante pour empêcher le passage en anaphase. La cellule reste alors bloquée en prométaphase/métaphase et éventuellement elle peut engager un programme de mort apoptotique (Jordan and Wilson, 2004). Cet rôle central des microtubules dans la mitose et la division cellulaire nous amène à suggérer qu'ils constitueront des cibles prometteuses dans la thérapie anti-tumorale. Plus précisément, certaines drogues anticancéreuses utilisées largement en clinique ciblent les microtubules ou leur dynamique. Les microtubules sont la cible préférentielle de plusieurs molécules naturelles toxiques produites par des plantes et des animaux. Bref, plusieurs composés ayant des effets sur les microtubules ont été découverts à la suite des criblages haut débit de produits naturels. Parmi les premiers à être développés se trouvent les alcaloïdes de Vinca, découverts il y a plus de 40 ans dans les feuilles de la pervenche (*Catharantus roseus* qui est aussi connue comme *Vinca rosacea*). Leurs effets toxiques sur la moelle osseuse ont été découverts par hasard pendant des études qui cherchaient à confirmer le rôle des alcaloïdes de Vinca comme anti-diabétique dans la médecine populaire. Depuis l'introduction des deux premiers dérivés des alcaloïdes de Vinca –vincristine et vinblastine- plusieurs études ont apporté une meilleure connaissance de leur mécanisme d'action (l'inhibition de la polymérisation) et, également, ont permis de souligner l'intérêt et l'efficacité des approches thérapeutiques combinatoires. Dans ces approches on a observé des effets synergiques en combinaison avec des autres médicaments de chimiothérapie.

Le paclitaxel ou taxol et ses dérivés ont représenté l'incorporation la plus importante à l'arsenal chi-

miothérapeutique de la fin du XX siècle. Le paclitaxel a été isolé à partir de l'écorce d'if en 1967 par Monroe Wall et Mansukh Wani. En 1979, la découverte par Peter Schiff et Susan Horwitz que le paclitaxel induit la polymérisation des microtubules, contrairement aux alcaloïdes de Vinca, conduit au développement clinique du taxol. Celui-ci a atteint son apogée au moment où des procédures pour la semi-synthèse chimique de ces produits sont apparues. En 1995, l'utilisation du paclitaxel a été approuvée et actuellement il est utilisé dans le traitement de plusieurs cancers dont celui des ovaires, des poumons, non-small-cell lung cancer et le sarcome de Kaposi. Ses principaux effets secondaires sont la neurotoxicité et myélosuppression.

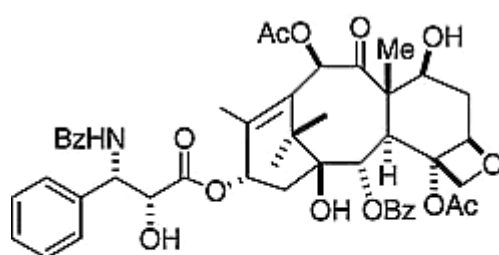


Figura 7.2. Structure chimique du paclitaxel ou taxol (Mulzer and Martin, 2004).

Les taxanes s'attachent faiblement à la tubuline soluble mais par contre, ils présentent une grande affinité tout au long du microtubule. La résolution cristallographique du paclitaxel sur les microtubules a permis de localiser le site de liaison du paclitaxel dans la sous unité β et plus précisément, sur la surface interne du microtubule. Cette liaison stabilise le microtubule et augmente sa polymérisation vraisemblablement grâce à un changement de conformation de la tubuline qui, par des mécanismes encore inconnus, augmente son affinité pour les molécules de tubuline voisines. Il existe un site d'union du paclitaxel à la tubuline dans chaque molécule de tubuline d'un microtubule et la capacité du paclitaxel d'accroître la polymérisation de la tubuline dépend de l'union stœchiométrique 1 :1 du paclitaxel à la tubuline dans les microtubules. Cependant, contrairement à la grand quantité de molécules des taxols requises afin d'augmenter la polymérisation du microtubule, on peut observer que l'union d'un group réduit de molécules de taxols suffit à stabiliser fortement la dynamique des microtubules. Par exemple, une seule molécule de paclitaxel associée à quelques centaines de molécules de tubuline d'un microtubule réduit un 50% le taux de raccourcissement du microtubule. La suppression de cette dynamique induit le blocage mitotique en absence d'assemblage des microtubules. Comme dans le cas des alcaloïdes de Vinca, c'est la suppression de la dynamique du fuseau qui empêche les cellules de franchir la transition de métaphase à l'anaphase. Ce fait pourrait être le responsable de la mort apopo-

tique des cellules. Le succès clinique des taxanes a poussé la recherche d'autres drogues qui induisent la polymérisation des microtubules. En parallèle, la synthèse chimique de ces produits a offert la possibilité de résoudre quelques problèmes dans la thérapie avec les taxanes, spécialement ceux en rapport avec la difficulté de formulation, l'administration et la susceptibilité à la résistance due à l'export de la drogue par la P-glycoprotéine. Parmi les composés nouvellement obtenus se trouvent les épothilones, la discodermolide, les sarcodictyines, l'éleutherobin et le laulimalide.

Les épothilones sont des métabolites toxiques issus de la myxobactérie *Sorangium Cellulosum*. Les épothilones sont des composés stabilisateurs des microtubules qui entrent en concurrence "in vitro" avec le paclitaxel pour la fixation aux microtubules (Goodin et al., 2004). Des études pré-cliniques montrent que les épothilones ont un large spectre d'action, et qu'elles sont actives dans certains modèles résistants au paclitaxel. En outre, certains analogues des épothilones présentent une activité anti-tumorale remarquable dans des premiers essais cliniques.

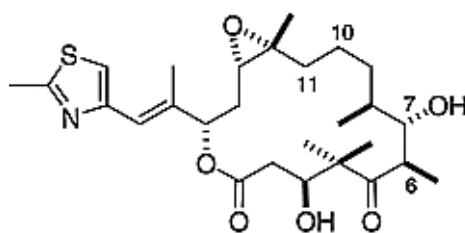


Figura 7.3. Structure chimique de l'épothilone B (Mulzer and Martin, 2004).

Finalement, le xantochymol et la guttiférone E ont été isolés à partir d'extraits solubles des fruits *Garcinia pyrifera*. Ces composés présentent une activité inhibitrice du désassemblage des microtubules semblable à celle du paclitaxel (Roux et al., 2000).

7.3 APPROCHES THERAPEUTIQUES ANTITUMORALES.

7.3.1 Selectivité par synergie

La pharmacologie antitumorale cherche la cible parfaite en visant deux caractéristiques. La première repose sur le fait que la cible soit essentielle (soit pour la prolifération soit pour la survie) et la seconde, qu'elle soit spécifique de la tumeur. Actuellement, la quantité de cibles présentant les caractéristiques précitées, est encore très limitée. L'exemple le plus célèbre est celui de la protéine Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique (Druker, 2002; Sawyers, 2002), à l'origine de l'extraordinaire

succès thérapeutique de l'inhibiteur pharmacologique de Bcr-Abl, Gleevec®, dans le traitement de cette maladie. Malheureusement dans la plupart des cas, une cible essentielle pour cellule tumorale, l'est aussi pour la cellule saine. La pharmacologie expérimentale continuera à rechercher des composés comme le Gleevec®. Cependant, elle ne va pas écarter des composés agissant par de mécanismes d'action innovateurs parce qu'ils ne soient "à priori" suffisamment spécifiques. Plus encore, on a pu voir que quelques composés déjà disponibles dans l'arsenal thérapeutique, peuvent être à l'origine d'approches thérapeutiques innovatrices lorsqu'on les administre en combinaison. Ce sont certaines de ces approches que nous allons décrire dans les paragraphes suivants :

Hartwell et al., (1997), ont suggéré de profiter thérapeutiquement des mutations dans les voies de signalisation cellulaire des cellules tumorales. Dans cette situation, le blocage d'une voie compensatoire se traduit par la mort cellulaire. Un exemple est celui des voies de réparation d'erreurs 3' → 5' de l'ADN pendant la réplication. Dans la levure, deux voies se présentent : celle qui agit par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase (*proofreading exonuclease activity*). Elle agit par l'élimination des bases incorrectes au fur et à mesure qu'elles sont incorporées à la chaîne en construction du ADN. Alternativement, une deuxième voie existe, celle qui répare les alignements incorrects (mésappariements) qui ont échappé à la capacité de correction de la polymérase (*mismatch repair system*). Quelques groupes de levures peuvent survivre sans l'un des deux systèmes de réparation mais, leur viabilité sera sérieusement compromise si les deux systèmes sont inactivés simultanément. L'utilisation d'une drogue inhibitrice de l'activité exonucléase de la polymérase, serait toxique pour les cellules présentant des mutations du système de réparation de mésappariements mais, ne présenterait pas d'effets délétères sur les autres cellules. Le traitement avec ce composé hypothétique déterminerait qu'une souspopulation de levures mutées soit un groupe à risque en comparaison avec le reste de la population sauvage (Hartwell et al., 1997). Dans le cas précité la toxicité était induite par la somme des effets d'une mutation aléatoire et d'une drogue inhibitrice. Dans les populations tumorales, on peut obtenir des effets semblables par la combinaison de deux ou de plusieurs drogues. Les drogues endommageant l'ADN sont spécialement toxiques pour les cellules ayant des défauts aux *checkpoints* (Dixon and Norbury, 2002). Le paclitaxel (PTX) inhibe la fonction des microtubules dans le passage de G2 à M et induit la mort dans les cellules en division (Rowinsky and Donehower, 1995; Abal et al. 2003). Les microtubules ne sont pas une cible spécifique des cellules tumorales, le traitement au PTX aura la même effectivité dans les cellules tumorales que dans les sauvages. D'un autre côté, il est largement accepté que la doxorubicine (DOX) arrête les cellules en G2 par la voie dépendante de p53. Une grande quantité de tumeurs ont des mutations dans la voie p53, et de ce fait, les agents thérapeutiques qui agissent par p53, ne seront pas capables d'arrêter les cellules tumorales en G2. Le traitement séquentiel avec DOX et PTX permet un gain de spécificité pour les cellules tumorales avec un p53 muté qui, premièrement n'arrêteront pas le cycle en réponse à la DOX

et deuxièmement, mourront par les effets toxiques du PTX lors du passage en mitose (Blagosklonny, 2002). Cette approche thérapeutique peut être définie comme “ sélectivité par synergie ”. Dans certaines tumeurs sans un p53 fonctionnel, la DOX peut toujours arrêter le cycle par Chk1. De ce fait, les cellules cancéreuses s’arrêteraient en G2 en réponse à la DOX et deviendraient résistantes au PTX. L’utilisation de UCN-01, un inhibiteur de Chk1, permet de surmonter cet inconvénient (comme représenté à la figure 7.4).

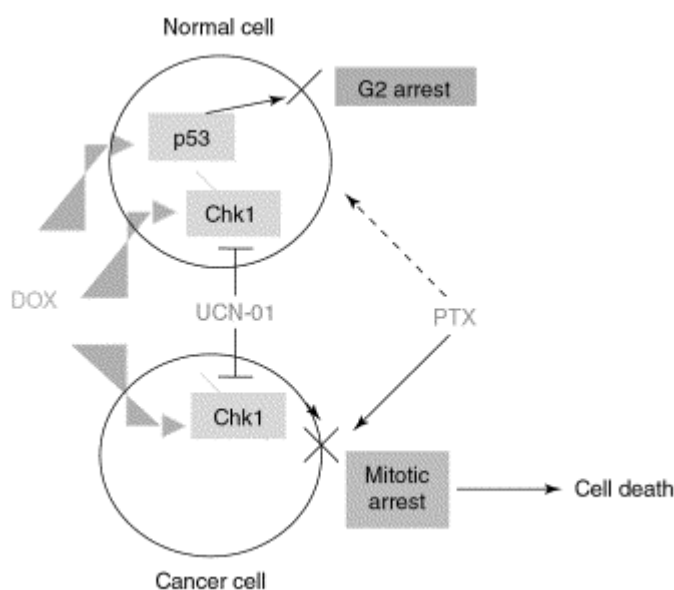


Figura 7.4. Identification de cibles compatibles pour le dessein rationnel des thérapies combinatoires. Thérapie dirigée contre 3 cibles : des faibles doses de doxorubicine (DOX) arrêtent la cellule en G2 par la voie dépendante de p53 et de Chk1. L’inhibition simultanée de Chk1 avec UCN-01, empêche l’arrêt du cycle des cellules cancéreuses, déficitaires en p53 mais avec un Chk1 toujours fonctionnel. Les cellules sauvages arrêtent la réplication en G2 par la voie p53 dépendante. Les cellules tumorales continueront dans la phase suivante du cycle et entreront en mitose. Pendant cette phase, elles seront éliminées par les effets toxiques du PTX en mitose (Blagosklonny, 2002).

Les deux exemples précités mettent en évidence que l’inhibition ciblée des protéines, profitant de la biologie moléculaire de la cellule tumorale, permet d’obtenir des effets synergiques antitumoraux non sur la létalité mais sur la sélectivité des composés (Blagosklonny and Darzynkiewicz, 2002). En outre, ces approches prétendent que la combinaison des drogues soit sélectivement toxique pour les cellules cancéreuses. Dans l’exemple de la combinaison PTX-DOX-UCN-01 pour le traitement des tumeurs déficitaires en p53: seulement le PTX a des effets toxiques sur les cellules, les autres deux composés sont chargés de rendre spécifique le traitement (Blagosklonny, 2002). C’est dans ce contexte de la sélectivité par synergie, que l’étude des drogues olomoucine et roscovitine, capables d’induire l’arrêt du cycle cellulaire et l’apoptose, présente un nouvel intérêt.

7.3.2 Thérapie séquentielle

Les thérapies séquentielles consistent en l'administration de plusieurs drogues d'une façon échelonnée dans le temps. Ces thérapies visent à augmenter l'effet des composés en traitement isolé.

Le taxol ou paclitaxel, a montré une grande efficacité antitumorale dans plusieurs types différents de tumeurs c'est pourquoi il se trouve parmi l'un des agents chimiothérapeutiques les plus actifs. La fonction du *checkpoint* d'assemblage du fuseau mitotique est requise pour l'induction de la mort en réponse au PTX. En conséquence, les molécules qui inhibent la fonction de ce checkpoint seraient susceptibles d'induire des résistances au PTX (Sudo et al., 2004). Alternativement, les cellules tumorales peuvent devenir résistantes au PTX par plusieurs mécanismes, parmi lesquels on peut citer : l'expression d'une pompe de xénobiotiques nommée MDR1 ou aussi, les mutations de la tubuline (au site de fixation du PTX à la tubuline). Un dernier mécanisme de résistance peut être considéré. Il s'agit du blocage de l'apoptose. La survivine est une protéine anti-apoptotique dont l'expression est régulée, entre autres, en fonction de la phase du cycle (exprimée préférentiellement lors de la transition G2/M). Cette protéine est surexprimée dans les cellules tumorales par rapport aux sauvages. Les toxiques des microtubules (TMs) induisent une réponse anti-apoptotique due à l'augmentation de la survivine (O'connor et al., 2002). Cette augmentation est indépendante de l'arrêt en G2/M provoqué par le PTX (Ling et al., 2004). La surexpression de cette protéine anti-apoptotique serait en partie, responsable de la résistance de quelques cellules au PTX. La diminution des effets anti-apoptotiques de la survivine pourrait supposer une nouvelle approche thérapeutique antitumorale dans la lutte contre les résistances.

Des efforts ont été faits pour optimiser les effets antitumoraux des taxoïdes à travers la combinaison avec des autres agents chimiothérapeutiques. L'association thérapeutique des taxoïdes avec d'autres composés antitumoraux classiques, supposerait aussi l'augmentation concomitante de la toxicité. Une alternative intéressante a été envisagée : la combinaison des taxoïdes avec des inhibiteurs pharmacologiques du cycle. Le but a été d'augmenter l'apoptose induite par les taxoïdes, et ainsi son efficacité antitumorale en face des résistances. Le flavopiridol est l'un des candidats déjà testé. Il appartient à la famille des flavonoïdes et a été découvert grâce à son efficacité d'inhibition de la tyrosine kinase du récepteur d'EGF (*Epidermal growth factor*). Les résultats des tests " in vitro " sur d'autres kinases, les CDKs, ont mis en évidence que le flavopiridol inhibe les CDK1, 2, 4, 6 et 7. La croissance des lignées tumorales est freinée en réponse à des doses nanomolaires de flavopiridol et l'arrêt observé se fait en phase G1 et G2 du cycle (Kaur et al., 1992). Egalement, les résultats de quelques études précliniques ont mis en évidence la potentialisation de la létalité (effets synergiques) observée lors du traitement séquentiel avec premièrement, plusieurs agents antitumoraux comme le PTX, la mitomicine-C, l'etoposide, le cisplatine, la gemcitabine ou la citarabine, et deuxièmement le flavopiridol. Des doses nanomolaires de flavopiri-

dol en combinaison avec la mitomicine-C ou après le traitement au PTX, augmentent significativement l'induction d'apoptose de quelques lignées cancéreuses (Schwartz et al., 1997; Motwani et al., 1999). Plus encore, on a observé que les effets de potentialisation de la mort entre le PTX et le flavopiridol dépendent de l'ordre d'administration des composés et que, les effets toxiques maximaux s'obtiennent quand l'administration du PTX précède celle du flavopiridol (Motwani et al., 1999). Le docétaxel présente une puissance cytotoxique plus forte que le PTX lors du traitement des lignées cellulaires humaines et murines. Cette toxicité supérieure est explicable par l'affinité supérieure du docétaxel par les microtubules (Riou et al., 1992).

Les taxoides induisent l'agrégation des microtubules et arrêtent les cellules en métaphase (Schiff et al., 1979). Le stop en métaphase est essentiel pour l'induction de l'apoptose. Motwani et al. (2003) ont mis en évidence que le flavopiridol potentialise les effets antitumoraux du DTX " *in vitro* " dans des lignées gastriques tumorales et " *in vivo* " dans des souris xénogreffées avec les lignées précitées. Ces effets sont associés à l'induction d'apoptose lors de la séquence de traitement DTX et puis flavopiridol. Le DTX induit un arrêt transitoire en phase M en même temps que l'augmentation de l'activité CDK1/cycline B (MPF ou métaphase promoting factor). Finalement, les cellules sortent de la phase M en diminuant les niveaux d'activité du MPF mais sans avoir réalisé la cytokinèse. Le traitement au DTX et puis au flavopiridol, augmente la quantité des cellules qui échappent au blocage de G2/M et qui finissent par mourir. En revanche, le prétraitement au flavopiridol, empêche l'activation du MPF nécessaire pour l'arrêt en G2/M en réponse au DTX. Le résultat est que la séquence de traitement flavopiridol-DTX n'est pas efficace dans l'induction de la toxicité.

L'épothilone B (épo B) est un toxique des microtubules qui n'appartient pas à la famille des taxoides mais qui présente un mode d'action identique. Récemment, on a mis en évidence ses effets antitumoraux sur des cellules tumorales résistantes au PTX ou au cisplatine. Le traitement d'une lignée cellulaire à l'épo B induit le changement conformationnel de Bax et sa translocation du cytosol à la mitochondrie, ce qui déclenchera, par la suite, la sortie du Cyt c, l'activation de la caspase 3 et l'apoptose (Yamaguchi et al., 2002). Le traitement séquentiel de deux lignées tumorales mammaires avec l'épo B et puis le flavopiridol, induit des effets additifs de mort (Wittmann et al., 2003).

Les composés inhibiteurs des CDKs auraient un mécanisme alternatif qui expliquerait la sensibilisation à la mort par d'autres drogues. Il a été rapporté dans la bibliographie, que dans certains cas, ils induisent une diminution des protéines anti-apoptotiques, telles que quelques membres de la famille de Bcl-2 ou les IAPs, parmi lesquels se trouve la survivine. La roscovitine rend les cellules plus sensibles à la mort en réponse à TRAIL à travers la diminution des niveaux de survivine et de XIAP (Kim et al., 2004a). Des effets sur les niveaux de protéines, ont été aussi décrits en réponse au flavopiridol. Les cellu-

les traitées diminuent les niveaux de quelques molécules anti-apoptotiques (XIAP, cIAP-2, Mcl-1, Bcl-xL et survivine) et sont sensibilisées à l'apoptose induite par l'épo B (Wittmann et al., 2003).

IV – RESULTATS

CARACTERIZATION OF APOPTOSIS INDUCED BY OLOMOUCINE AND ROSCOVITINE

Experiments made in our group and exposed along this section, allow us to conclude:

1. Cell death induced by olomoucine and roscovitine in SH-SY5Y cells is concentration- and time-dependent. All the morphological and biochemical hallmarks of apoptotic are found in this experimental paradigm. No subpopulations display morphological characteristics indicating alternative types of cell death.
2. Olomoucine and roscovitine used at both, lethal and sublethal concentrations, are not inducing neurite outgrowth, therefore cell differentiation (seen in Fig.8.1).
3. Differentiated SH-SY5Y cells display an increased resistance to olomoucine and roscovitine. The extent of the resistance seems to correlate with the differentiation one.
4. Bcl-2 or Bcl-X_L overexpression do not protect cells from olomoucine or roscovitine challenge. This makes the implication of a mitochondrial-initiated pathway less probable in our experimental paradigm.
5. SH-SY5Y treated cells are partially protected by the caspase inhibitor z-VAD-fmk. A initiating caspase seems to be activated in some of the cell subpopulations.
6. The inhibitors of protein synthesis display protective effects on olomoucine- and roscovitine-induced cell death. The protective effects increase if z-VAD-fmk is also present. This synergism allows to define three putative subpopulations in the cell culture (seen in Fig.8.2).

		Time (hours)				
		3	6	24	48	72
Olo	10 μ M					
	30 μ M	-	-	- / ☹	- / ☹	- / ☹
	100 μ M					
Iso	10 μ M					
	30 μ M	-	-	-	-	-
	100 μ M					
Rosco	2,5 μ M					
	10 μ M	-	-	- / ☹	- / ☹	- / ☹
	25 μ M					
STS	50 nM	+	+	+ / ☹	+ / ☹	n.d.
	100 nM					

Figura 8.1. Olomoucine and roscovitine used at lethal or sublethal concentrations are not inducing SH-SY5Y differentiation. SH-SY5Y cells were treated at the concentrations stated in the figure for the periods of time indicated in the figure. Cells were observed through contrast phase microscopy. Differentiation was checked by the presence of neuritogenesis (+). The absence of neurites (-) and the presence of dead is also indicated (sad face). *n.d.* means non determined.

7. The treatment of our neuroblastoma cell line with two drugs inhibiting the MAPK pathway (PD 98059 and UO126), do not induce cell death. Thus, the putative inhibition of Erk1/Erk2 by this CDK inhibitory drugs, is not the cause of apoptosis in SH-SY5Y cells.
8. Olomoucine and roscovitine do not change the cell content of Fas-L/Fas proteins.
9. CASP8 and 10 genes are methylated and silenced in SH-SY5Y cells (Eggert et al., 2001). Olomoucine and roscovitine, do not induce the reexpression of these genes. Therefore, CASP8 and 10 involvement in this experimental paradigm can be ruled out.
10. Olomoucine and roscovitine induce apoptosis in the HL-60 cell line (p53 -/-) in a range of concentrations equivalent to that of SH-SY5Y one (p53 +/-).

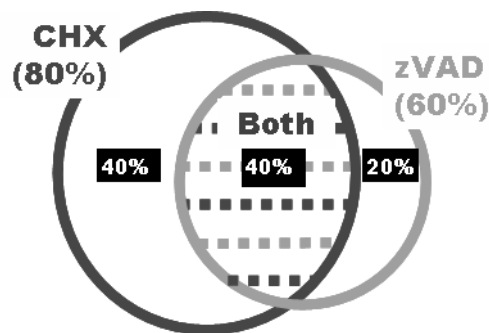


Figura 8.2. Proposed SH-SY5Y subpopulations based on CHX and zVADfmk protective effects. We have hypothesized each subpopulation has de origin in the phase the cell was cycling at the moment of olomoucine or roscovitine treatment.

8.1 ARTICLE 1.

Cell differentiation, caspase inhibition, and macromolecular synthesis blockage, but not BCL-2 or BCL-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs

Judit Ribas and Jacint Boix*

Molecular Pharmacology Group, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Catalunya, Spain

Received 22 July 2003, revised version received 20 November 2003

Abstract

Olomoucine and Roscovitine are two ATP-competing compounds described as specific inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDK). Both drugs showed to induce apoptosis in SH-SY5Y, a neuroblastoma-derived cell line. In these cells, neither Bcl-2 nor Bcl-XL overexpression conferred any resistance to both drugs. However, a partial protective effect was detected when cells were treated with a general inhibitor of caspases (zVADfmk), cycloheximide (CHX), or actinomycin D (DAct). Interestingly, a synergism in cell protection was observed between zVADfmk and macromolecular synthesis inhibitors, thus suggesting different apoptotic pathways in distinct subpopulations of the cell culture. On the other hand, no lethality was found when cells were treated with either PD98059 or UO126. This discarded Erk1/Erk2 inhibition as the cause of apoptosis. Furthermore, SH-SY5Y cells became resistant to either Olomoucine or Roscovitine upon the induction of differentiation. This resistance correlated with the extent of differentiation and, therefore, the number of cells entering a quiescent state. In conclusion, our results seem to support a role for CDK inhibition as the cause of the apoptotic process triggered by Olomoucine and Roscovitine. In addition, we contribute to define a promising profile as anticancer drugs for both compounds, at least in the treatment of neuroblastoma.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Olomoucine; Roscovitine; CDK; Apoptosis; Bcl-2; Bcl-XL; Caspase; Cycloheximide; Erk; SH-SY5Y

Introduction

Protein kinases are pivotal elements in the regulation of cellular functions. The human genome is estimated to contain 518 protein kinases grouped in seven major evolutionarily defined families [1]. Most human pathologies are the result of cellular dysfunction. Protein kinases are involved in either the genesis or the modulation of most of these dysfunctions. As a consequence, protein kinases become an obvious target for the design of new drugs. Cyclin-dependent kinases (CDK) are a family of protein kinases involved in the ordered succession of the cell cycle phases. CDK are controlled by several independent mechanisms such as the binding of positive and negative regu-

latory proteins, the state of phosphorylation, and the location inside the cell [2]. Their pharmacological modulation is approached with increasing interest by the drug industry. Based on an ATP-competing mode of action, several drugs are presently available to inhibit CDK. These drugs display a variable degree of specificity [3–5]. Staurosporine (STS), for instance, is an unspecific inhibitor of protein kinases with a spectrum that includes CDK. Other compounds, like UCN-01 or Flavopiridol, have reached clinical phases of development as anticancer drugs. Flavopiridol is the best example of a first generation of inhibitors, specific for CDK but with a low discriminating power among CDK subtypes. A second generation of compounds with increased specificity toward a precise set of CDK has been also synthesized. Olomoucine and Roscovitine belong to this second generation and show “in vitro” specificity for CDK1, CDK2, and CDK5 [6,7].

Neoplasia is characterized by an uncontrolled cell proliferation. In this context, the pharmacological inhibition of CDK implies the stop of the cell cycle and a brake to cell

* Corresponding author. Molecular Pharmacology Group, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure, 44, 25198-Lleida, Catalunya, Spain. Fax: +34-973702426.

E-mail address: jacint.boix@cmb.udl.es (J. Boix).

proliferation [8]. This can be defined as a cytostatic effect. In addition, CDK inhibitory drugs could induce cell differentiation. STS, for instance, stimulates cell differentiation of neuroblastoma [9]. Cell differentiation is a mechanism that opposes to cancer development. Therefore, a differentiation effect must be considered in these drugs. Finally, these drugs are effective in triggering apoptosis [4,8]. As a consequence, a cytotoxic effect completes a promising profile as anticancer agents. Surprisingly, there are few studies approaching the cell and molecular mechanisms involved in the induction of apoptosis by this type of drugs.

Apoptosis is a specific type of cell death. Apoptosis was initially defined on a morphological basis, in brief cell shrinking and fragmentation, chromatin condensation and phagocytosis by neighboring or specialized cells. Apoptosis is an ordered process, an orchestrated succession of cell and molecular events shared by most experimental paradigms of the phenomenon. In the process, we can distinguish three phases named induction, execution, and resolution. The resolution phase is the latest one and comprises the cell fragmentation and phagocytosis phenomena. The execution phase is defined by caspase activation [10,11]. Caspases are a family of proteases characterized by having a cysteine in their catalytic center and cleaving proteins at aspartic residues. As a consequence, the acronym caspase was coined [12]. The intracellular activation of caspases causes specific proteolysis in a specific set of proteins that translates into the cell apoptotic phenotype [13]. The mechanisms that lead to caspase activation have been classified into two pathways, the intrinsic and the extrinsic pathway. The extrinsic pathway is initiated in membrane receptors, Fas or TNF-R1 for instance, named death receptors (DR). Upon binding of their specific ligands, these receptors transduce their death signal by a caspase, mainly caspase 8 [14]. Therefore, the pharmacological inhibition of Caspase 8 implies the blockage of the death signal and cells are able to survive facing killer ligands like Fas-L or TNF. The intrinsic pathway is defined by mitochondrial implication. Mitochondria seem to act as a cell damage sensor that releases a set of proteins, kept in their intermembrane space, upon stressing stimuli. Cytochrome *c* is one of such proteins and acts by promoting the apoptosome assembly and the specific activation of caspase 9 [15]. In this context, the pharmacological inhibition of caspases blocks most of the characteristic features of apoptosis, but does not avoid cell death [9]. These mitochondrial events are regulated by the Bcl-2 family of proteins [16]. These proteins contain homology domains that allow reciprocal interactions, and specific differences of affinity can be found among them. Some members are Bcl-2 agonists and act by preventing apoptosis (Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, etc.). The others (Bax, Bak, Bid, etc.) behave as antagonists and promote it. Bcl-2 and Bcl-XL are able to inhibit the translocation of cytochrome *c* to the cytoplasm. As a consequence, their overexpression in a cell implies an increased resistance to stimuli activating the intrinsic pathway.

The induction of apoptosis by the pharmacological inhibition of CDK is the focus of our research interests. Little is known about the molecular events that take place and connect cell detection of CDK dysfunction and apoptosis. In order to investigate these mechanisms, we decided to use Olomoucine and Roscovitine, two CDK inhibitory drugs. As a cell model, we chose SH-SY5Y, a cell line derived from a human neuroblastoma. One reason was our previous experience in characterizing the apoptotic phenotype and the molecular mechanisms triggered by STS in these cells [9,17,18]. Another reason was their remarkable capability to differentiate in cell culture conditions [9,19]. In these cells, Olomoucine and Roscovitine behaved as effective inducers of apoptosis. In order to elucidate the biochemical pathways involved, we examined the effects of Bcl-2 and Bcl-XL overexpression and were null. In addition, we tested caspase inhibition and the blockage of new protein expression. Either action reduced apoptosis and displayed synergism in doing so. Finally, the induction of differentiation in the cell cultures minimized the ratios of cell death and apoptosis. The implications of these results envisaging cell cycle phases, apoptosis, and cancer therapy will be discussed further.

Materials and methods

Antibodies and chemical reagents

Anti-Bcl-2 (clone 124) monoclonal antibody was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). AntiBcl-XL (Catalog # B22630) monoclonal antibody was acquired from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). AntiRb (clone G3-245) was provided by BD Biosciences (Madrid, Spain). Anti- β -actin (clone AC-15) and secondary peroxidase-conjugated antibodies were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Olomoucine, Iso-Olomoucine, Roscovitine, PD98059, and Geneticin (G418) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). UO126 was purchased from Tocris (Bristol, UK). zVADfmk (Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) and AcDEVDafc (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) were obtained from Enzyme Systems Products (Livermore, CA, USA). zVADfmk (N-1510) is presently being obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). zVADfmk from Enzyme Systems Products was used at a concentration 50 μ M. zVADfmk from Bachem requires a concentration 100 μ M to yield equivalent results. Fetal calf serum was supplied by Life Technologies/Gibco BRL (Barcelona, Spain). CellTiter 96[®] and Cytotox 96[®] kits were provided by Promega (Madison, WI, USA). Transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) reactions were performed with the In situ Cell Death Detection kit, Fluorescein, from Roche (Barcelona, Spain). Culture media, STS, bisBenzimide (Hoechst 33342), propidium iodide, cycloheximide (CHX), and actinomycin D

(DAct) were purchased from Sigma. Unless otherwise stated, the nonlisted reagents were also from Sigma.

Cell lines, specific culture conditions, and drug treatments

SH-SY5Y cells were grown as reported before [9,17]. SH-SY5Y populations transfected with the pcDNA3/Bcl-2, pcDNA3/Bcl-XL, and empty pcDNA3 vectors were obtained and characterized in previous research projects [9]. We have observed a reduced proliferation in Bcl-2 overexpressing cells; this implied a growing advantage for Bcl-2 nonexpressing cells. In order to keep overexpression in most cells, G-418 was permanently present in cultures unless the experiment was terminal. In addition, Bcl-2 levels were routinely checked by Western blot. A similar strategy was applied to Bcl-XL-overexpressing and pcDNA3/empty control populations. Along our experiments, cell cultures were periodically checked for mycoplasma contamination and were repeatedly negative by PCR assays. To induce differentiation in SH-SY5Y cells, we followed an established procedure [19]. In brief, cells were cultured on collagen-coated plates, and 10 μ M RA (*all-trans*-Retinoic Acid) was added for 5 days. RA was purchased from Tocris. Culture dishes and other plastic disposable tools were supplied by Corning (Corning, NY, USA), Sarstedt (Newton, NC, USA), Bibby Sterilin (Staffordshire, UK), and Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA). Olomoucine and Iso-Olomoucine were dissolved in DMSO at a concentration of 50 mM. Roscovitine and zVADfmk were prepared with DMSO at a concentration of 20 mM. Finally, STS was also adjusted with DMSO to 1 mM. From these working stock solutions, drugs were added to complete media. Then serial dilutions were performed to obtain the final concentrations reported in the text and figures. The resulting DMSO concentration never surpassed 1% in the medium. At this concentration, we have determined that DMSO does not influence SH-SY5Y cell viability, differentiation, or neurite outgrowth. CHX and DAct were soluble in culture media and adjusted to the final concentrations reported also in text and figures.

Cell viability and cell death determinations

CellTiter 96[®] kit provides the MTS reagent, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt. MTS is a water-soluble tetrazolium salt that permeates cell membranes and is chemically reduced to a colored formazan salt inside metabolically competent cells. This fact allows the determination of viability in cell cultures. MTS-derived formazan salt is characterized by being water-soluble, thus circumventing cell lysis or DMSO-dissolving steps required in the similar MTT procedure [17]. The assay is devised to be applied to multi-well plates, thus easing the performance of many independent determinations and further statistical analysis. We plated 40.000 SH-SY5Y cells/well in 96

multi-well plates (M96), routinely. Color changes were quantified by an ELISA plate reader after 24 h of drug treatment. Final values were the result of subtracting 620 nm from 490 nm lectures. Lectures proved to be linear following 3–6 h of incubation in MTS. Each experimental condition was systematically tested in several wells and each experiment repeated several times, as stated in the figure legends. Cell viability ratios were obtained by referring values from treated to those of untreated control cultures.

Cytotox 96[®] kit provides the reagents and standards to determine lactate dehydrogenase activity (LDH) in culture media or cell lysates. LDH enzyme is released from cells only upon membrane rupture; as a consequence, its measurement quantifies death ratios in cell cultures. The assay is also devised to be performed in multi-well plates. In the LDH assays, we plated M96 with 30.000 SH-SY5Y cells/well. Following 48 h of drug treatment, LDH release was determined according to the kit instructions. In apoptosis, the LDH release is a later event than the decrease of MTS reduction. As a consequence, only at 48 h of drug treatment LDH determinations were consistent with MTS ones, which were performed at 24 h. The increase in LDH was detected as a change in color that was quantifiable by an ELISA plate reader. Final values were also the result of subtracting 620 nm from 490 nm lectures. Each experimental condition was systematically tested in several wells and each experiment repeated several times, as stated in the figure legends. Cell death ratios were obtained by referring the LDH values in the medium of a treated culture to the total LDH content of an equally treated control culture. The total LDH content is the result of cell lysis by addition of Triton X-100 to the culture medium, at a final concentration of 0.9%. The LDH value of complete medium and complete medium plus 0.9% Triton X-100 was subtracted from the corresponding values. The cell death percentage found in untreated cultures was averaged and subtracted from the final death ratios.

Apoptosis assessment

We have used five different criteria to assess apoptosis in cell cultures. First is nuclear morphology as evidenced by direct 0.05 μ g/ml bisBenzimide (Hoechst 33342) staining and fluorescence microscopy. Frequently, bisBenzimide/propidium iodide double staining was performed. In this case, propidium iodide was added at a final concentration of 25 μ g/ml. Second is the large DNA fragments of approximately 50 kbp (kilobase pairs). This DNA fragmentation was detected by a reported procedure [20]. However, we used a contour homogeneous electric field (CHEF) system (BioRad, Hercules, CA, USA) to perform the agarose gel electrophoresis of the DNA samples. The running conditions were 15 h, at 6 V/cm, initial switching time of 50 s, and final switching time of 90 s. Third is the internucleosomal DNA fragmentation. The ladder pattern of DNA degradation was easily detected by a standard electropho-

resis in 1.5% agarose gels. Fourth is the surge and increase of effector caspase activity. We employed a procedure based on reading the fluorescence released from the AcDEVDafc synthetic substrate after its direct addition to the culture medium, detergent cell lysis, and incubation at 37°C. This method allows measurements in a M96 format and has been validated in our previous works [9,18]. As a minor improvement, Nonidet P-40 detergent has been reduced to 1.6% in the 2× lysis buffer. Finally, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assays were performed according to the kit instruction manual. Flow cytometry readings were obtained by an EPICS® XL unit from Coulter Científica, SA (Madrid, Spain).

Cell cycle analysis

Cell cultures were kept on ice and incubated for 15 min in 25 µg/ml propidium iodide, 10 µg/ml RNase A, and 0.1% Triton X-100. Then, cell suspensions were subjected to analysis in the flow cytometer referred before.

Protein extractions and Western blotting

To study cytochrome *c* release from mitochondria, a 0.05% digitonin cytosolic extraction was performed according to a reported procedure [21]. To obtain whole cell extracts, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), lysed in a lysis-buffer containing 100 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml pepstatin, sonicated, and boiled for 5 min. Following a centrifugation at 12000 × *g* for 15 min, the protein concentration was determined in the supernatants by the DC Protein Assay from BioRad. These supernatants were subjected to electrophoresis in SDS 7–12% polyacrylamide gels. Based on the protein assay, equal amounts of protein were loaded per lane. Then, proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) by a MINI® trans-blot module from BioRad. Membranes were reacted with the primary antibodies described above. Immunoblots were finally developed with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody and either the SuperSignal® West Pico or the SuperSignal® West Dura reagents from Pierce (Rockford, IL, USA).

Results

Characterization of the cell death process induced by Olomoucine and Roscovitine in SH-SY5Y cells

In order to characterize the lethal effects of Olomoucine and Roscovitine on the SH-SY5Y cell line, cells were cultured on M96 and subjected to serial dilutions of these drugs. After 24 h of treatment, cell viability was deter-

mined by measuring the ability to reduce MTS (Fig. 1A). Olomoucine and Roscovitine induced cell death in a concentration-dependent manner. The drug concentration lethal for 50% of the cell population (LC₅₀) was 127.5 and 25 µM, respectively. This was consistent with the “in vitro” reports about Roscovitine being a more potent CDK inhibitor than Olomoucine [3,4]. Concentrations had to be raised to 200 µM Olomoucine or 50 µM Roscovitine to kill most of the cell population after 1 day of treatment. Therefore, these higher concentrations have become the most frequently employed in our studies. On the other hand, Iso-Olomoucine is an isomer of Olomoucine that causes “in vitro” CDK inhibition at concentrations far greater than Olomoucine. As it is shown in Fig. 1A, Iso-Olomoucine did not cause cell death in the same range of Olomoucine concentrations. As a consequence, Iso-Olomoucine has become the most appropriate negative control in our experiments.

As we have commented before, cell viability measurements were based on determinations of the cell ability to reduce MTS. Since cell reduction potential can decrease by other contingencies not related to cell death, all along our experiments we decided to confirm our MTS data by an independent procedure. The chosen procedure was the quantification of the LDH activity released into the culture medium (Fig. 1B). This parameter indicates cell membrane rupture and, unequivocally, cell death. Though it is also adapted to M96 assays like the MTS method, there is a difference to be noted between both procedures. In the MTS procedure, the values from treated cultures can be only referred to those of control untreated ones to obtain the percentage of cell viability. In the LDH procedure, the values of LDH released in the treated cultures can be referred to the total LDH content of analogously treated cultures, where total LDH has been released by cell lysis. This limits the number of determinations to be performed per plate and reduces the feasibility to study the broad range of concentrations attainable with the MTS procedure (e.g., compare Figs. 1A and B). However, LDH method allows the direct calculation of cell death percentages. A parameter that is complementary to the cell viability one obtained with the MTS procedure. Along our experiments, LDH and MTS procedures yielded complementary values in a reproducible and consistent manner.

Once we had standardized the concentration and time parameters for cell death induction, we proceeded to characterize the type of cell death triggered by Olomoucine and Roscovitine in SH-SY5Y cells. First, we characterized the nuclear morphology of cells by chromatin staining with bisBenzimide and fluorescence microscopy. As shown in Fig. 2A, Olomoucine and Roscovitine generated the reduced size and condensed nuclei, progressively more fragmented, typical of apoptosis. These images were not found in cultures of SH-SY5Y cells treated with Iso-Olomoucine. Then, we analyzed the DNA of Olomoucine-, Roscovitine-, and Iso-Olomoucine-treated cells in agarose gel electropho-

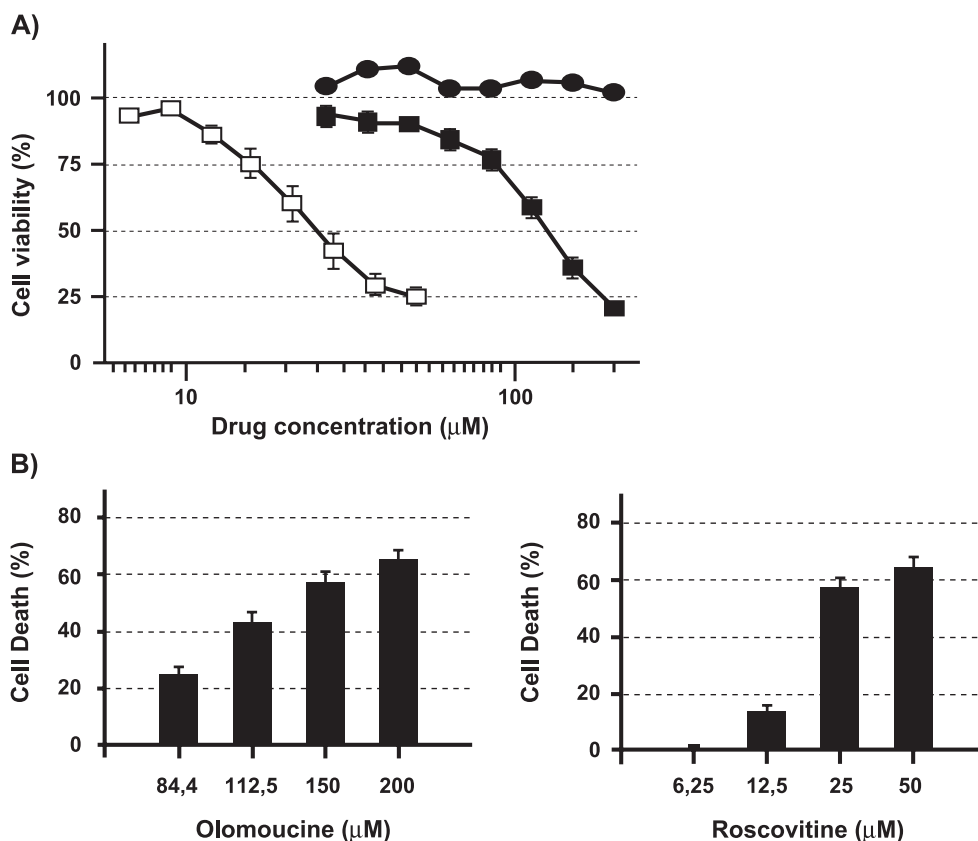


Fig. 1. Cell death induced by Olomoucine and Roscovitine was concentration-dependent. (A) SH-SY5Y cells in culture were treated for 24 h with Roscovitine (□) in a range of concentrations 6.7–50 μM . Cells were also treated with Olomoucine (■) and Iso-Olomoucine (●) in a range of concentrations 26.7–200 μM . Cell viability was quantified by the MTS reduction assay. The survival percentage was obtained by referring the obtained values to those of control untreated cells. Every point is the mean \pm SEM (standard error of media) of at least five independent experiments with six independent determinations per experiment. (B) SH-SY5Y cells were treated for 48 h with either Olomoucine or Roscovitine at the concentrations specified. Cell death was measured by determining the LDH released to the culture medium. The percentage was calculated by referring this value to that of the total LDH content of a control culture subjected to the same treatment. In addition, the cell death percentage found in untreated cultures was averaged and subtracted from the displayed final death ratios. Every bar indicates the mean \pm SEM of at least four independent experiments with at least three independent measurements per experiment.

resis under continuous or contour-clamped homogeneous electric field (CHEF). As expected, Olomoucine and Roscovitine generated the internucleosomal DNA degradation and the 50 kbp fragments characteristic of apoptosis (Fig. 2B). In order to assess the mitochondrial involvement in this apoptotic process, we characterized the cytoplasmic translocation of cytochrome *c*. After 9 h of treatment, cells treated with Olomoucine (Fig. 2C) and Roscovitine (not shown) but not Iso-Olomoucine displayed cytochrome *c* in a cytosolic fraction. The subsequent activation of effector caspases was tested by evidencing the specific proteolysis of several substrates like poly-ADPribose polymerase (PARP), Fodrin, and Lamin B1 in Western blots (not shown). Alternatively, we followed a more quantitative approach by determining the activation kinetics of effector caspases 3 and 7. The surge and extent of DEVD cleaving activity (DEVDase activity) was measured by the fluorescence released, upon cleavage, from a synthetic substrate (AcDEVDafc). As shown in Fig. 2D, a linear increase in DEVDase activity was found up to 9 h of drug treatment. Olomoucine and Roscovitine kinetics did not differ signif-

icantly. However, as expected, Iso-Olomoucine kept DEVDase activity at basal levels. In conclusion, all the apoptotic features we had so far checked were positive. Olomoucine and Roscovitine caused cell death by inducing apoptosis in SH-SY5Y cells.

MTS and LDH procedures are characterized to quantify all types of cell death and not only the apoptotic type. The characterization of apoptosis we have just described is basically qualitative. Therefore, a matter of concern was if a significant amount of cells were undergoing a non-apoptotic type of cell death. As we have mentioned before, we have routinely performed bisBenzimide/propidium iodide double staining, and propidium iodide had never evidenced a significant population of dead cells without apoptotic features. In order to definitively discard this issue, we quantified apoptosis by counting individual cells by flow cytometry. The TUNEL procedure was chosen to label the apoptotic cells. As shown in Fig. 2E, barely all cells became TUNEL positive after 48 h of treatment. In other words, they had undergone apoptotic cell death.

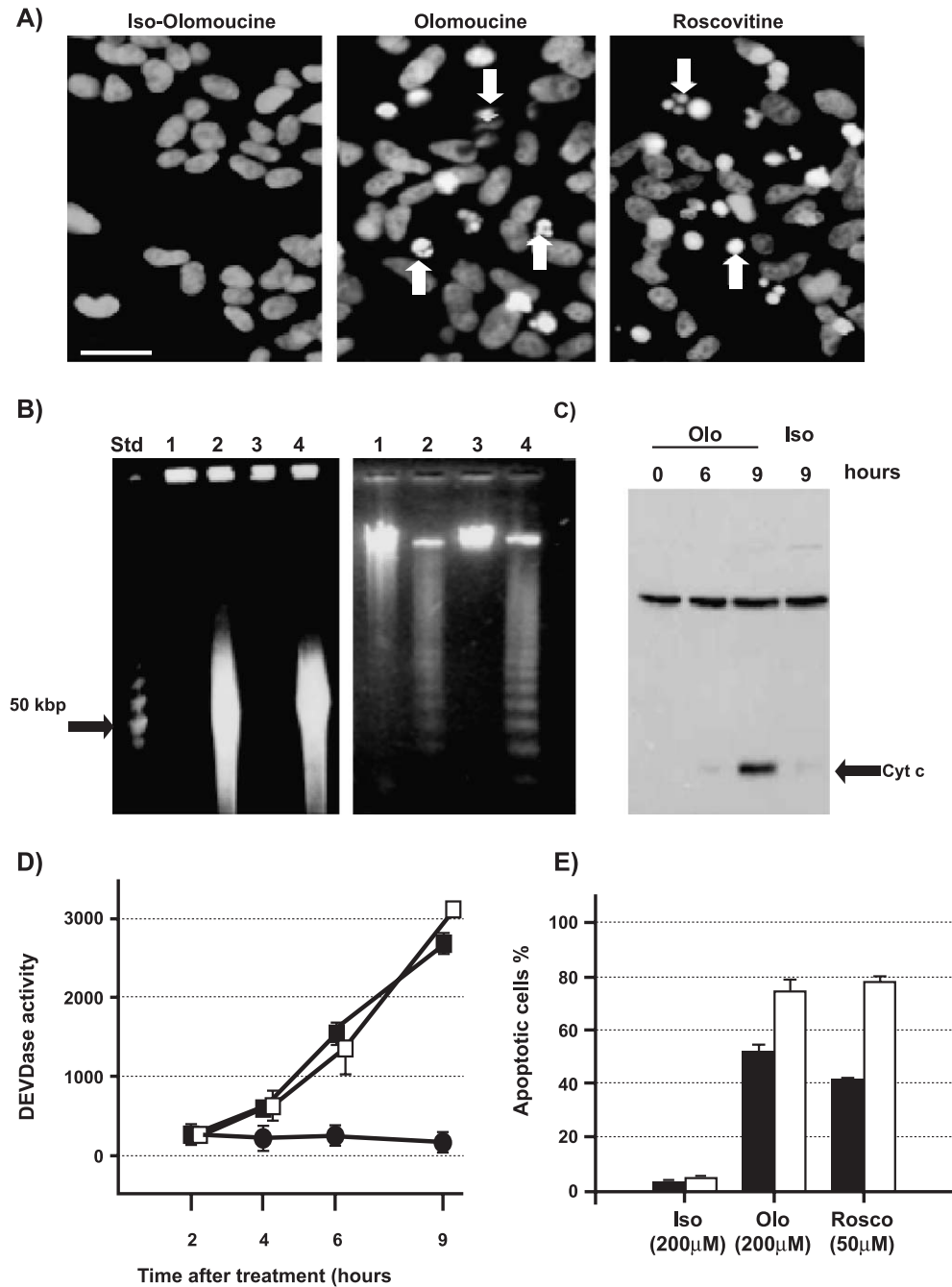


Fig. 2. Olomoucine and Roscovitine induced apoptosis in SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were treated for 24 h with 200 μ M Iso-Olomoucine, 200 μ M Olomoucine, and 50 μ M Roscovitine. Following bisBenzimide staining of DNA, cells were photographed with an inverted fluorescence microscope. Arrows point to chromatin condensations typical of different stages of the apoptotic process. Scale bar = 50 μ M. (B) DNA was extracted from cells untreated (1) or treated for 12 h with 200 μ M Olomoucine (2), 200 μ M Iso-Olomoucine (3), or 50 μ M Roscovitine (4). The ladder pattern of DNA degradation that characterizes apoptosis was detected in 1.5% agarose gels. The large DNA fragmentation that is characteristic of apoptosis was resolved by a CHEF electrophoresis. Std is a commercial standard of DNA. The position of the 50 kbp band is indicated in the figure. (C) SH-SY5Y cells were treated with 200 μ M Olomoucine and 200 μ M Iso-Olomoucine. Then cytosolic extracts were performed at the time periods indicated in the figure. These extracts were analyzed by Western blot to show the release of cytochrome *c* from mitochondria. The identity of the upper band is unknown but is a useful control of the amount of protein loaded per lane. (D) Time-course of effector caspase activation (DEVDase activity measured in arbitrary fluorescence units). SH-SY5Y cells were treated with 200 μ M Olomoucine (■), 200 μ M Iso-Olomoucine (●), and 50 μ M Roscovitine (□) for the time periods indicated in the graph and the fluorescence released from a AcDEVDafc substrate was determined. Every point is the mean \pm SEM of two independent experiments with two independent measurements per experiment. (E) Cells were treated as indicated in the graph, subjected to the TUNEL procedure, and analyzed by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells is indicated after 24 (full bars) and 48 h of treatment (open bars). The bar is the mean \pm SEM of at least two independent experiments.

Effects of Bcl-2 and Bcl-XL overexpression on Olomoucine and Roscovitine-induced apoptosis

As we have commented before, Bcl-2 and Bcl-XL overexpression is a very effective resource to prevent apoptosis in many experimental paradigms, particularly, in those characterized by following an intrinsic or mitochondrial pathway. Therefore, we were interested to know if any of these proteins could afford some protection to SH-SY5Y cells challenged with Olomoucine or Roscovitine. SH-SY5Y populations overexpressing either Bcl-2 or Bcl-XL protein were available from our previous studies. Both proteins conferred resistance to SH-SY5Y facing STS, being Bcl-XL overexpression far more protective than

Bcl-2 one [9]. Along the following experiments, the protection from STS treatments was routinely tested as a control of Bcl-2 or Bcl-XL overfunction.

The viability profiles of SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-2 and pcDNA3/empty cell populations were determined by the MTS procedure after 24 h of treatment with either Olomoucine or Roscovitine (Fig. 3A). No difference was observed between both populations. Cell death was also assessed by the LDH procedure, and the null protective effect of Bcl-2 was also confirmed (Fig. 3B). Bcl-2 overexpressing cells continued to die displaying an apoptotic phenotype as revealed by bisBenzimide (not shown), and the ladder pattern of DNA degradation (Fig. 3C). Bcl-2 is a protein constitutively expressed by

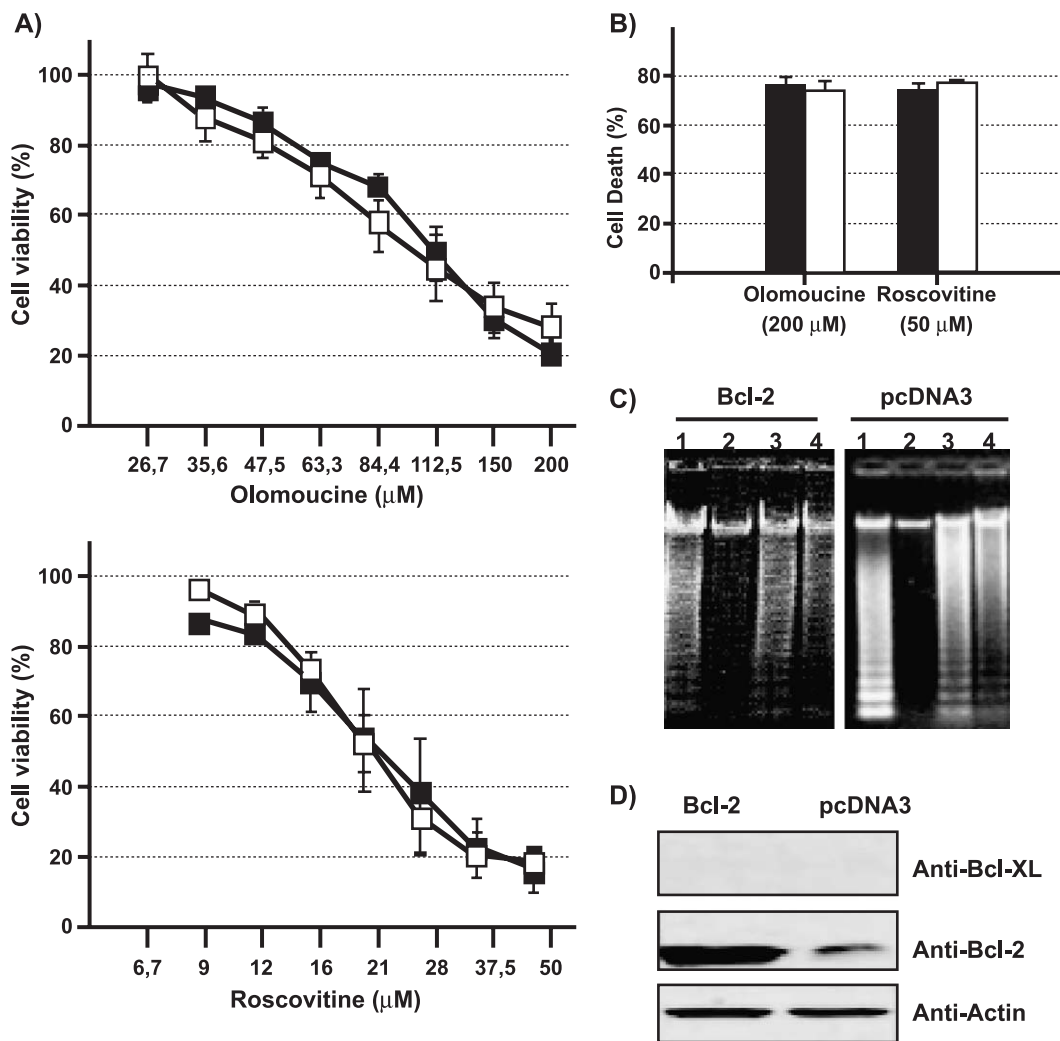


Fig. 3. Bcl-2 overexpression did not protect cells from Olomoucine or Roscovitine challenge. (A) SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-2 (□) and pcDNA3/empty (■) cell populations were compared following a 24-h treatment with either Olomoucine or Roscovitine, as indicated in the graphs. Cell survival was assessed by the MTS procedure as in Fig. 1. Every point is the mean ± SEM of three independent experiments with six independent measurements per experiment. (B) SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-2 (open bars) and pcDNA3/empty cell populations (full bars) were also treated with Olomoucine and Roscovitine for 48 h. Cell death was determined by the LDH procedure. Every bar is the mean ± SEM of two independent experiments with three independent determinations per experiment. (C) DNA ladders in 1.5% agarose gels. Cells were treated for 12 h with 1 µM STS (1), 200 µM Iso-Olomoucine (2), 200 µM Olomoucine (3), and 50 µM Roscovitine (4). (D) The Bcl-XL and Bcl-2 content of pcDNA3/Bcl-2 and pcDNA3/empty cell populations. Western blots were performed and reacted with anti-Bcl-XL and anti-Bcl-2 antibodies. Anti-actin antibody was used to demonstrate equal protein load.

SH-SY5Y cells; however, the Bcl-2 content resulting from overexpression was neatly greater (Fig. 3D). As shown also in this figure, Bcl-2 overexpression did not change the Bcl-XL content, which remained undetectable in our Western blots.

Analogously, we determined the viability of SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-XL cells subjected to Olomoucine or Roscovitine treatments (Fig. 4A). As shown in the figure, Bcl-XL overexpression did not protect from these drugs either. The LDH release determinations confirmed this assertion (Fig. 4B). SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-XL cells were dying by apoptosis as evidenced by the internucleosomal DNA degradation (Fig. 4C). Note the first lane of this image, where no ladder is observed in cells that have been treated with STS. As stated before, this is a control of an excess of Bcl-XL function in these cells [9]. On the other hand, Bcl-XL overexpression did not change the cell content of Bcl-2 (Fig. 4D). In summary, neither Bcl-2 nor Bcl-XL over-

function was able to modify the death ratios caused by Olomoucine and Roscovitine treatments. A Bcl-2 or Bcl-XL regulated pathway to initiate apoptosis; in other words, a conventional intrinsic pathway seemed not to be activated by these drugs.

Effects of zVADfmk on SH-SY5Y cells facing Olomoucine and Roscovitine

It is broadly accepted that in the extrinsic pathway, the signal from the death receptors is driven through caspase activation. Therefore, the pharmacological inhibition of caspases translates into cell survival in these models. Conversely, in the intrinsic pathway, caspase inhibition translates into blockage of the apoptotic features, but the ratios of cell death remain unchanged. These facts prompted us to study the effect of caspase inhibition in cells treated with Olomoucine and Roscovitine. We chose zVADfmk by its

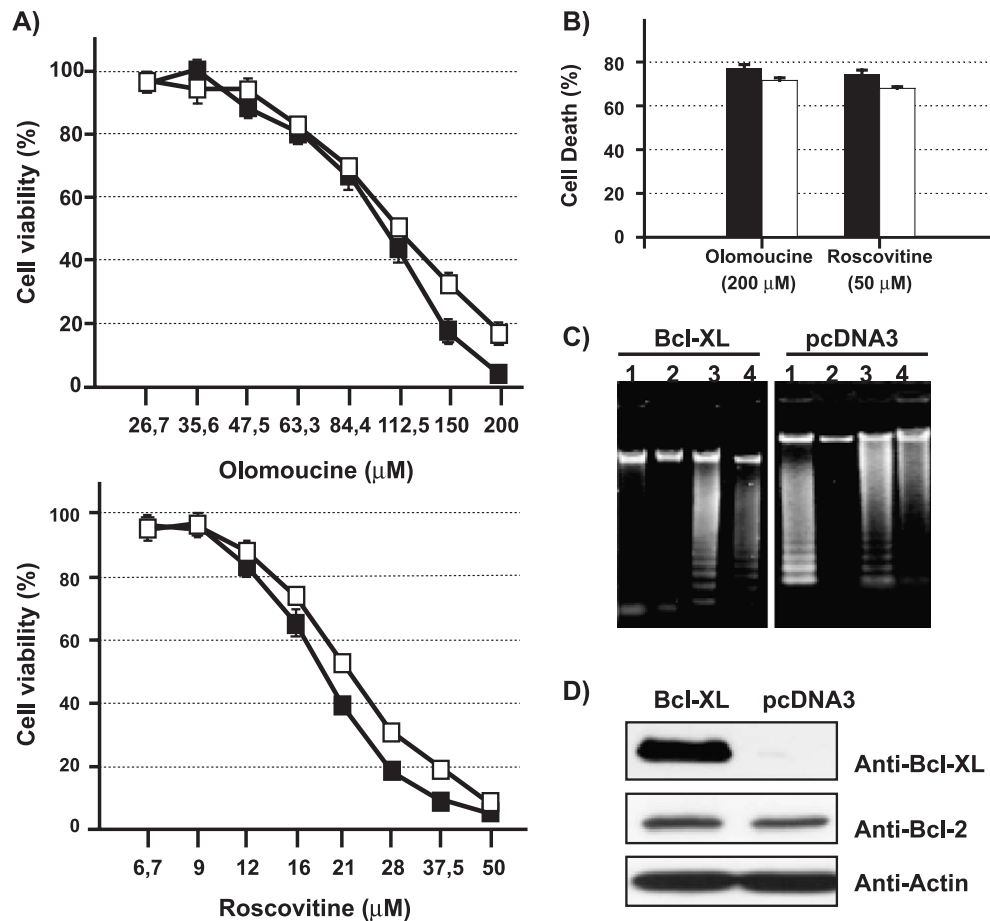


Fig. 4. Bcl-XL overexpression did not protect cells from Olomoucine or Roscovitine challenge. (A) SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-XL (□) and pcDNA3/empty (■) cell populations were compared following a 24-h treatment with either Olomoucine or Roscovitine, as indicated in the graphs. Cell survival was assessed by the MTS procedure as in previous figures. Every point is the mean \pm SEM of three independent experiments with six independent measurements per experiment. (B) SH-SY5Y pcDNA3/Bcl-XL (open bars) and pcDNA3/empty cell populations (full bars) were also treated with Olomoucine and Roscovitine for 48 h. Cell death was determined by the LDH procedure. Every bar is the mean \pm SEM of two independent experiments with three independent determinations per experiment. (C) DNA ladders in 1.5% agarose gels. Cells were treated for 12 h with 1 μ M STS (1), 200 μ M Iso-Olomoucine (2), 200 μ M Olomoucine (3), and 50 μ M Roscovitine (4). (D) The Bcl-XL and Bcl-2 content of pcDNA3/Bcl-XL and pcDNA3/empty cell populations. Western blots were performed and reacted with anti-Bcl-XL and anti-Bcl-2 antibodies. Anti-actin antibody was used to demonstrate equal protein load.

broad spectrum of caspase inhibition. The addition of 50 μM zVADfmk to SH-SY5Y cells challenged with Olomoucine resulted in an increase of cell viability (Fig. 5A) and a corresponding decrease in the cell death ratios (Fig. 5B). Similar results were obtained if Roscovitine was used

instead of Olomoucine (Figs. 5A, B). The protection afforded by zVADfmk was partial, since many cells continued to die. Dying cells did not show the typical features of apoptosis. For instance, bisBenzimide/propidium iodide double staining showed no nuclear fragmentation in the

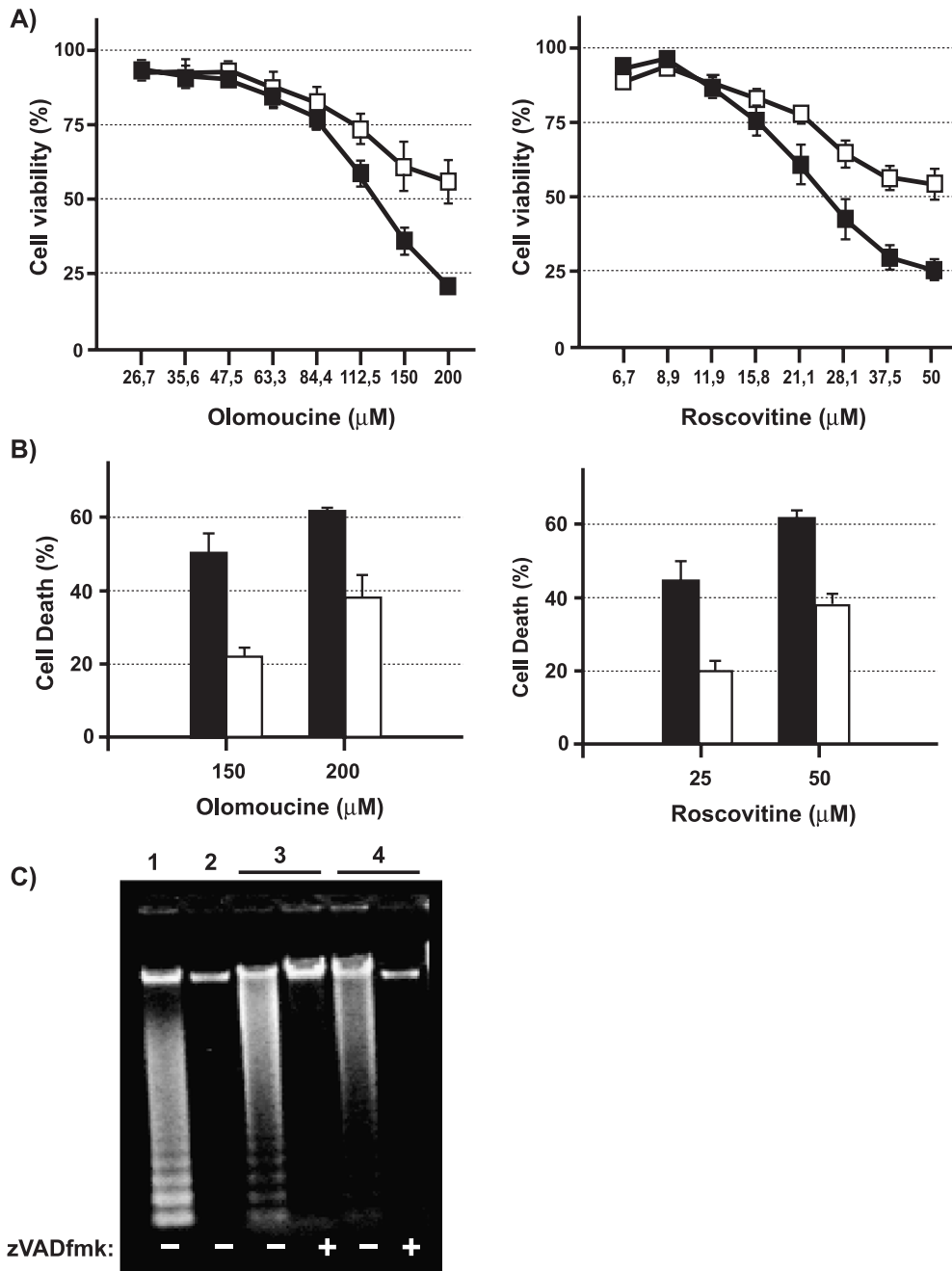


Fig. 5. SH-SY5Y cells were partially protected from Olomoucine and Roscovitine challenge by zVADfmk. (A) SH-SY5Y cells were treated with Olomoucine or Roscovitine for 24 h in the presence (\square) or absence (\blacksquare) of 50 μM zVADfmk in the culture medium. Cell survival was assessed by the MTS procedure. Every point is the mean \pm SEM of five independent experiments with six independent measurements per experiment. (B) SH-SY5Y cells were treated for 48 h as indicated in the figure. The culture medium contained (open bars) or did not contain (full bars) 50 μM zVADfmk. To circumvent zVADfmk decay, it was refreshed at 24 h of treatment. Every bar indicates mean \pm SEM of at least three independent experiments with at least three independent measurements per experiment. (C) SH-SY5Y cells were treated for 12 h with 1 μM STS (1), 200 μM Iso-Olomoucine (2), 200 μM Olomoucine (3), and 50 μM Roscovitine (4). As shown in the picture, some cells were cultured in the presence of 50 μM zVADfmk. DNA was extracted and internucleosomal DNA degradation observed in agarose gels.

dead cells (not shown). Consistently, no apoptotic DNA ladder was seen despite that cell death was taking place (Fig. 5C). In summary, zVADfmk was capable of blocking the apoptotic phenotype in all cells but prevented cell death in only a subpopulation.

We observed that Olomoucine and Roscovitine were very stable in culturing conditions; however, zVADfmk experienced an important decay after 24 h in these conditions. By carefully refreshing zVADfmk after 24 h of culture, we found that its protective effect could be maintained up to 48 h of Olomoucine and Roscovitine treatment (Fig. 5B). This suggested that the aforementioned cell subpopulation could survive in the presence of either Olomoucine or Roscovitine, as far as zVADfmk was active and caspases were inhibited. This behavior is characteristic of the apoptotic models that follow an extrinsic pathway. Taken together with the previous Bcl-2 and Bcl-XL results, all the data were pointing to a type I extrinsic pathway or, alternatively, to a caspase initiating event in the apoptotic process of this cell subpopulation.

In a few experiments Olomoucine concentration was raised to 800 μM ; interestingly, zVADfmk maintained the percentage of cell viability at 56.96 ± 0.91 in this condition. Note that this viability value did not differ significantly from that observed at 200 μM . This indicated that greater concentrations of Olomoucine did not trigger any additional new mechanism of cell death, or if Olomoucine did, it was also blocked by zVADfmk.

Effect of CHX and DAct on SH-SY5Y cells treated with Olomoucine or Roscovitine

In the characterization of apoptosis models, a frequently asked question has been the requirement of new protein synthesis for the process to be accomplished. To answer this question, CHX and DAct have been generally used. In our experiments, we employed these reagents at concentrations far above those described to inhibit macromolecular synthesis. Initially, we tested the direct toxicity of these concentrations on SH-SY5Y cells (Fig. 6A). After 48 h of treatment, neither CHX nor DAct caused significant amounts of LDH release. The cell death ratios were 10.3 ± 2.1 for CHX and 20.2 ± 1.6 for DAct. The lower toxicity of CHX justified its preferential use in further experiments. Moreover, these concentrations of CHX were not able to activate effector caspases in SH-SY5Y cells (see Figs. 6D, E). In conclusion, up to 48 h of treatment, CHX was not efficiently inducing apoptosis in the SH-SY5Y cell line.

The effect of CHX and DAct on cultures of SH-SY5Y cells treated with either Olomoucine or Roscovitine was then assayed. As shown in Fig. 6C, both compounds performed very well at preventing cell death. The ratios of cell protection surpassed those afforded by zVADfmk alone. The results obtained by the MTS procedure were also confirmed by the LDH method (Fig. 6B). Next we

wondered about a possible synergism between macromolecular synthesis and caspase inhibition. As displayed in Figs. 6B and C, this synergism was found. In conclusion, three SH-SY5Y cell subpopulations seemed to exist in our cultures. A population of cells is protected by CHX but not by zVADfmk. An overlapping population is protected by both compounds, and finally, a small population is protected only by zVADfmk (this is schematized in Fig. 9). In order to demonstrate that a subpopulation was eluding CHX protection, DEVDase activation kinetics was determined in SH-SY5Y cell cultures. As expected, CHX was only partially inhibiting DEVDase activity in SH-SY5Y cells treated with 200 μM Olomoucine (Fig. 6D) or 50 μM Roscovitine (Fig. 6E). This coincided with the apoptotic phenotype observed in the scarce cells not protected by CHX (bisBenzimide images, not shown).

On the other hand, we explored the possible effects of protein synthesis inhibition on cell cycle regulation. We explored CDK activity by analyzing the state of phosphorylation of a known substrate, the Rb protein. As shown in Fig. 6F, the reduction in Rb phosphorylation was already detectable after 24 h of treatment with CHX. The implications of this result will be discussed further.

Olomoucine, Roscovitine, and cell differentiation in SH-SY5Y cells

Another interesting aspect concerning the mode of action of Olomoucine and Roscovitine is their putative ability to induce the differentiation of SH-SY5Y cells. We have tested low and high doses, short and long times of incubation, and looked for a perceptible neurite outgrowth. The results were repeatedly negative, particularly if compared with the prominent neuritogenesis caused by STS [9] or RA differentiating treatments (Fig. 7A).

Cell differentiation is a physiological process that implies a downregulation of CDK function. Therefore, we thought of studying the effect of cell differentiation on cell sensitivity to Olomoucine and Roscovitine. SH-SY5Y cells were seeded on collagen-coated plates and treated with 10 μM RA for 5 days. The result was a cell population displaying a differentiated phenotype (Fig. 7A) and mostly arrested in G0/G1 phase of the cell cycle (Fig. 7B). The CDK inhibition associated with differentiation was checked by analyzing the state of phosphorylation of Rb protein. As expected, Rb was found to be hypophosphorylated in the differentiated cells (Fig. 7C). In conclusion, a cell population mostly in a quiescent state was available to test the effects of Olomoucine and Roscovitine. Not surprisingly, differentiation implied an increase of cell viability in our experimental paradigm as measured by the MTS procedure (Fig. 7D). This result was also confirmed by the LDH method (not shown). To better characterize the resistance associated with the differentiation process, we performed an experiment in which we determined the protection

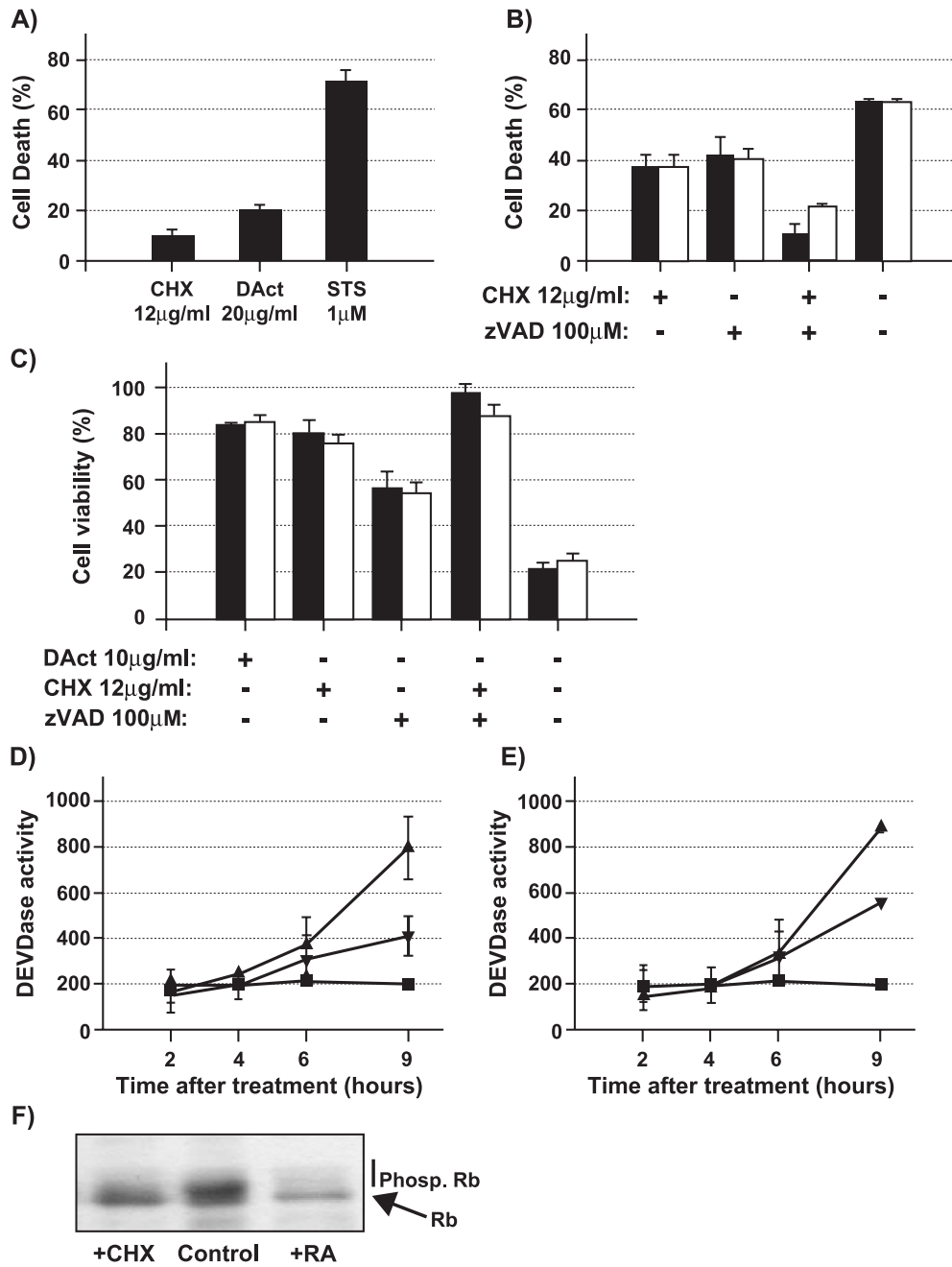


Fig. 6. Inhibitors of new protein synthesis prevented apoptosis largely than zVADfmk in SH-SY5Y treated with either Olomoucine or Roscovitine. (A) SH-SY5Y cells were treated for 48 h with CHX, DAct, and STS at the concentrations reported in the graph. LDH release was determined to quantify cell death. As evidenced, the toxicity derived from the inhibition of new protein synthesis was low. (B) Cells were also challenged with 200 µM Olomoucine (full bars) and 50 µM Roscovitine (open bars), in the absence or presence of CHX, zVADfmk, or both. Cell death was quantified following the LDH procedure. Bar value is the mean \pm SEM that results from at least two independent experiments with at least three independent measurements per experiment. (C) Cells treated with 200 µM Olomoucine (full bars) and 50 µM Roscovitine (open bars) were also treated with DAct, CHX, and zVADfmk as indicated in the graph. Cell viability was obtained by measuring the reduction of MTS. Bar value is the mean \pm SEM of three experiments with six independent measurements per experiment. (D) Time course of effector caspase activation was determined in SH-SY5Y cells treated with 200 µM Olomoucine (\blacktriangle), 12 µg/ml CHX (\blacksquare), or both (\blacktriangledown). Every point is the mean \pm SEM of two independent experiments with two independent measurements per experiment. (E) Time course of effector caspase activation in SH-SY5Y cells challenged with 50 µM Roscovitine (\blacktriangle), 12 µg/ml CHX (\blacksquare), or both (\blacktriangledown). Every point is the mean \pm SEM of two independent experiments with two independent measurements per experiment. DEVDase activity was measured in arbitrary fluorescent units. (F) CHX induced hypophosphorylation of Rb protein. Rb from proliferating (control), 12 µg/ml CHX for 24 h (+CHX), and 10 µM RA for 5 days (+RA) treated SH-SY5Y cells were analyzed by Western blot.

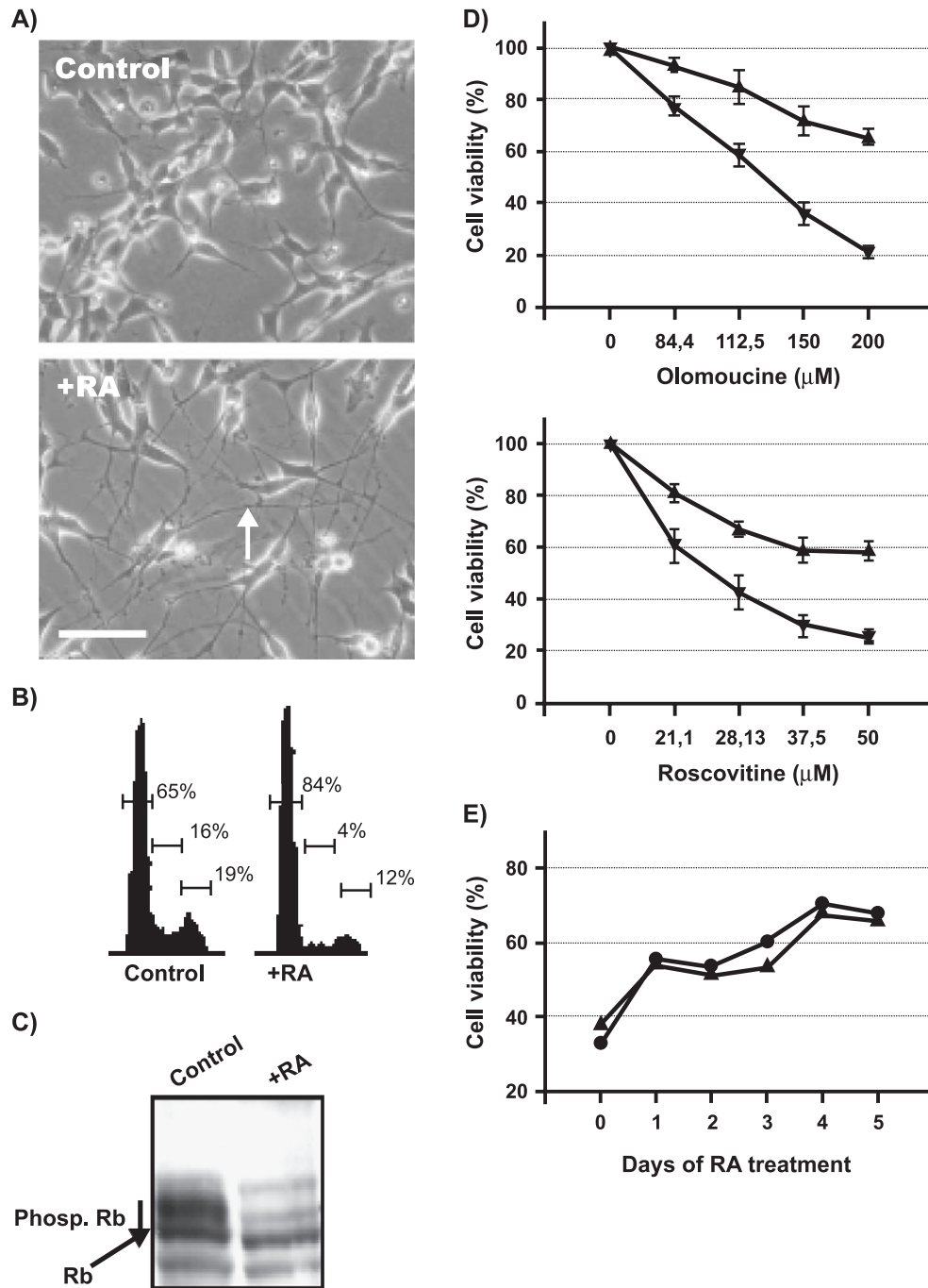


Fig. 7. Differentiated SH-SY5Y cells displayed an increased resistance to Olomoucine and Roscovitine. (A) Phase contrast photographs of control and RA-differentiated SH-SY5Y cells (+RA). The arrow points to the prominent neurite projections characteristic of neuronal differentiation. Scale bar = 100 μ M. (B) Cell cycle profile of control and differentiated SH-SY5Y cells. Differentiation implied S phase reduction and cell accumulation in G0/G1 phase. The profile is representative of several recorded profiles, obtained along the differentiation experiments. (C) The state of phosphorylation of Rb protein was determined by Western blot. The hyperphosphorylation characteristic of a growing control population decreases in a non-cycling differentiated one (+RA). (D) SH-SY5Y cells differentiated with RA for 5 days (\blacktriangle), and proliferating untreated controls (\blacktriangledown) were treated for 24 h with Olomoucine and Roscovitine in the range of concentrations shown. Cell viability was quantified by the MTS assay. Every point is the mean \pm SEM of at least five independent experiments with six independent determinations per experiment. (E) SH-SY5Y cells were differentiated with RA for the days indicated in the graph. Then 200 μ M Olomoucine (\bullet) or 50 μ M Roscovitine (\blacktriangle) were added to the culture and cell viability determined after 24 h. Cell resistance to both drugs increased proportionally to the days of RA treatment. Cell viability was quantified by the MTS procedure. Every point is the mean \pm SEM of six independent determinations.

afforded by shorter times of differentiation. As shown in Fig. 7E, there was a strong correlation between cell resistance and the time required for an optimal differenti-

ation. At time 0, no protection was found, thus ruling out the putative protective effects of 10 μ M RA and of culturing on collagen-coated plates. A minimum of 24 h,

for differentiation to take place in the absence of Olomoucine or Roscovitine, was required to begin to detect some resistance.

Effect of PD98059 and UO126 compounds on proliferating SH-SY5Y cells

Extracellular regulated kinases (Erk1 and Erk2) have been described as targets of Olomoucine, Roscovitine, and other closely related compounds [4,22]. In order to explore the involvement of these kinases in our model, we proceeded to evaluate the lethal effects of PD98059 and UO126 on SH-SY5Y cells. PD98059 and UO126 are not chemically related; however, they are both cell-permeable and selective inhibitors of MAP kinase kinase (MEK). This implies the inhibition of Erk1/Erk2 enzymatic activity. Both compounds were employed at final concentrations known to inhibit Erk1/Erk2. We observed no reduction in SH-SY5Y cell viability, either measured by the MTS procedure at 24 h (Fig. 8A) or determined by the release of LDH after 48 h of treatment (Fig. 8B). Consistently, no increase in effector caspase activity was found up to 9 h of treatment (Fig. 8C). In these experiments, STS was used as a positive control to induce cell death by apoptosis. Our PD98059 and UO126 compounds proved to be active when periodically checked in standardized measurements of Erk1/Erk2 activation in response to neurotrophins [23]. In conclusion, a putative inhibition of Erk1/Erk2 by Olomoucine and Roscovitine was ruled out as the cause of apoptosis in SH-SY5Y cells.

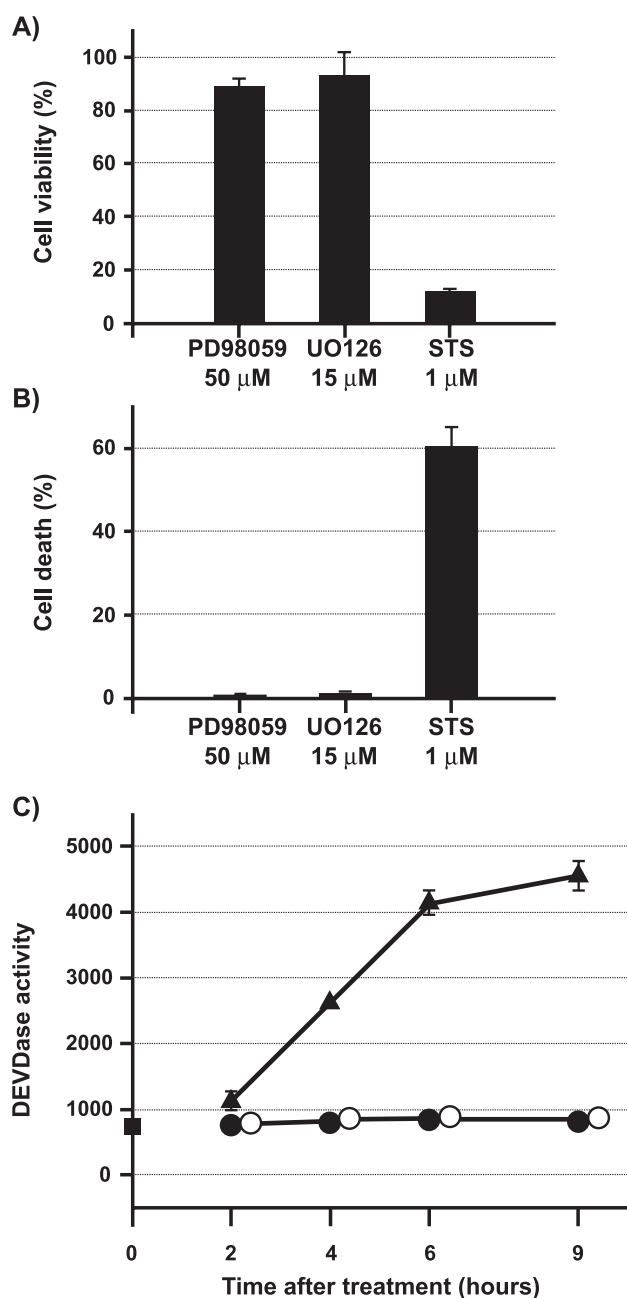


Fig. 8. PD98059 and UO126 did not induce cell death in SH-SY5Y cells. (A) Cells were treated as indicated in the figure. STS was used as a positive control of cell death. Cell viability was measured by the MTS procedure. The mean \pm SEM of three independent experiments with at least six independent measurements per experiment is shown. (B) Cells were treated as before and cell death was determined by the LDH procedure. Every bar is the mean \pm SEM of two independent experiments with at least three independent determinations per experiment. (C) Time-course of effector caspase activation. SH-SY5Y cells were treated with 50 μ M PD98059 (○), 15 μ M UO126 (●), and 1 μ M STS (▲) for the time periods indicated. The value of control untreated cells is placed at time 0 (■). DEVDase activity was measured in arbitrary fluorescence units. Every point is the mean \pm SEM of at least five independent determinations.

Discussion

In this work, we have characterized some basic aspects of the cell death process triggered by two CDK inhibitory drugs, Olomoucine and Roscovitine, in a human cell line derived from neuroblastoma, SH-SY5Y. We have determined the cell death process to be dose-dependent and the range of concentrations that caused it. Care was taken not to rely on only one procedure to quantify cell death. Two different methods detecting independent cell death phenomena were used. In fact, a nonquantifiable third one, cell detachment and fragmentation, was routinely assessed and was always congruent with the numerical data. We have identified apoptosis as the type of cell death induced by Olomoucine and Roscovitine. In order to gain insight into the mechanisms activated to generate apoptosis, we used SH-SY5Y cells overexpressing functional Bcl-2 and Bcl-XL proteins. Surprisingly, no protective effect was found. This result is in agreement with the one reported in HeLa cells overexpressing Bcl-2 and facing Flavopiridol [24]. It has also been reported that an increased Bcl-2 content does not afford any resistance to Flavopiridol in cells from a chronic B lymphocytic leukemia [25]. However, Bcl-2 overexpression proved capable of protecting MB-468 breast cancer cells from this drug [26]. One report is also found about Roscovitine that induced apoptosis being prevented by Bcl-2 overexpression in a human leukemia cell line [27]. Finally, Bcl-2 and Bcl-XL prevented apoptosis triggered by a new CDK1-specific inhibitor, CGP74514A [28]. We have

not detected any additional report addressing this specific issue. For the drug and cell type contingency, notwithstanding, we have not found any satisfactory explanation for the discrepancies.

In order to inhibit a broad spectrum of caspases, we used zVADfmk and found it was not only able to inhibit the apoptotic phenotype but cell death caused by Olomoucine and Roscovitine. The inhibition of cell death was partial and seemed to be maintained as long as zVADfmk was not degraded. This indicated a caspase initiating event in a specific subpopulation of the cell culture. Moreover, the null protective effect of Bcl-2 and Bcl-XL suggested that this subpopulation was behaving like cells following a type I extrinsic pathway. Usually, this means the involvement of Fas-type death receptors (DR). However, the initiation of a caspase cascade in the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus can mimic a type I pathway [29]. Moreover, the cascade could be initiated in the nucleus, where CDK exert their function. Interestingly, caspase 9 has been described to be inhibited by forming a complex with survivin in mitotic cells. A complex which integrity is dependent upon CDK1 mediated phosphorylation of survivin [30]. Therefore, pharmacological inhibition of CDK1 should imply caspase 9 release and a type I apoptosis in a subpopulation of mitotic cells. Before exploring these alternative pathways, in our future experiments we will try to discard first the involvement of DR in the apoptotic process induced by Olomoucine and Roscovitine.

Protein synthesis inhibition by CHX and DAct reduced Olomoucine- and Roscovitine-induced apoptosis. A similar result has been reported in a lung carcinoma cell line treated with Flavopiridol [31]. The effect of CHX and DAct on apoptosis was an important point in the early times of apoptosis studies, which has not attracted much attention afterwards. In many models, both agents prevented apoptosis from occurring. In these models, the synthesis of new proteins was hypothesized to be required for apoptosis to take place. In other models, both agents triggered cell death by themselves and defined the release type of apoptosis [32]. In the release models, the existence of a short-living, apoptosis-blocking protein, which is continuously synthesized, was hypothesized. In both types of models, there has been a very limited success in identifying the hypothesized gene products. The molecular machinery of apoptosis has revealed to be constitutive and not to require new protein synthesis to be activated [10,14,15]. An increase of reduced glutathione, caused by CHX, was proposed to prevent oxidative stress and to be the explanation of the CHX antiapoptotic properties [33]. We propose an alternative hypothesis, CHX and DAct are going to block the synthesis of cyclins [34,35], then inhibit CDK and stop the cell cycle. If cells are able to withstand this insult, as SH-SY5Y cells seem to, they will no longer offer a target for CDK inhibitory drugs. Indeed, we have evidence that CHX and DAct markedly stop cell growth in SH-SY5Y cells (estimations from the total LDH content). This is consistent with

the Rb hypophosphorylation we have found in CHX-treated SH-SY5Y cells (Fig. 6F). Moreover, our hypothesis is reinforced by the study of thymocytes [36,37] and neuronal cell [38,39] models in which CDK activity is required for apoptosis to be accomplished. In these experimental paradigms, Olomoucine and Roscovitine have been useful tools to block apoptosis and to confirm the CDK involvement. Based on our hypothesis, CHX should prevent apoptosis in these paradigms. This seems to be the case either in thymocytes [40,41] or in the neuronal models [42,43].

Another important point is the synergy observed between protein synthesis inhibition and zVADfmk treatments. Based on this combination of treatments, we can distinguish three different subpopulations in a culture of SH-SY5Y cells, each subpopulation following a specific pathway toward cell death (schematized in Fig. 9). In two pathways, there is an apical event blocked by CHX. In the third one, the apical event seems to be the initiation of a caspase cascade. In the CHX-protected cells, some are also protected by caspase inhibition while others are not. In conclusion, Olomoucine and Roscovitine seem to trigger different molecular mechanisms that lead to apoptosis in SH-SY5Y cells. We believe that the cell cycle is the cause of this heterogeneity. We favor the hypothesis that the referred subpopulations reflect the phase in which the cell was cycling at the moment of drug treatment. Fig. 9 is a working hypothesis that we expect to test in the future. We will study the apoptotic process triggered by Olomoucine and Roscovitine in synchronized populations of SH-SY5Y. Following a similar approach, Flavopiridol has demonstrated to increase the induction of apoptosis in transformed cells synchronized in S phase [44].

The specificity of drugs is a general matter of concern in pharmacological studies. Presently, research efforts are

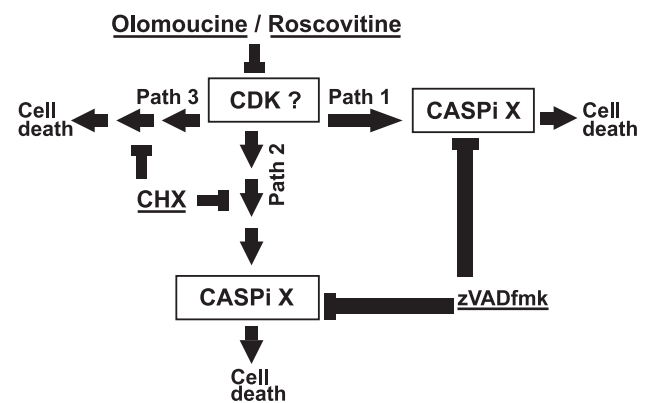


Fig. 9. Scheme of the putative pathways leading to cell death in SH-SY5Y cells facing Olomoucine or Roscovitine treatment. The three pathways are defined by the synergism detected between CHX and zVADfmk (Fig. 6C). Each pathway defines a specific subpopulation in the culture of SH-SY5Y cells. We believe a specific cycle phase is underlying each subpopulation. This is a working hypothesis. Each pathway is initiated by the pharmacological inhibition of CDK. CDK? means that the specific CDK number (either 1 or 2) is not known. CASPi means an initiating caspase, not an effector one. X is the unknown number identifying this specific caspase.

being devoted to characterize as much “in vivo” targets of these CDK inhibitory drugs as possible. These new targets could help to explain the biological actions and the putative lack of specificity of these compounds [45]. However, in our experiments, elevated Olomoucine concentrations seem not to engage additional mechanisms leading to cell death. In addition, we have discarded the involvement of Erk1/Erk2 inhibition as the mechanism causing apoptosis. We do not know if Olomoucine and Roscovitine can inhibit other CDK subtypes in our cells, for example, CDK8 and CDK9. These CDK subtypes are mainly involved in transcriptional activation. Consistently, Roscovitine has demonstrated the ability to inhibit transcription in herpesvirus [46] and human cells [47]. Therefore, it could be proposed that Olomoucine and Roscovitine could be apoptotic agents through their inhibition of transcription. Our results do not support this hypothesis. Let us remember that very high concentrations of CHX or DAct do not induce apoptosis in SH-SY5Y cells (Fig. 6A). In other words, SH-SY5Y cells do not display a release model of apoptosis. Another advantage of the SH-SY5Y cell line is the capability to be differentiated in cell culture conditions. Differentiation implies cell quiescence and a physiological downregulation of CDK activity. If apoptosis is the result of CDK inhibition by Olomoucine and Roscovitine, cell resistance would be expected in differentiated SH-SY5Y cells. Though partial, as partial is probably the extent of differentiation in the culture, the resistance has been evidenced in our work. Obviously, we cannot exclude other differentiation-related events capable of explaining the resistance to both compounds. However, taken together our results, we believe that the role of CDK1 and CDK2 as targets for Olomoucine and Roscovitine in apoptosis induction has been reinforced.

In the Introduction, we commented the putative cytostatic, differentiation-inducing, and cytotoxic properties of Olomoucine and Roscovitine to treat cancer. No differentiation-inducing properties have been observed in SH-SY5Y cells; however, both compounds have induced apoptosis efficiently. Apoptosis induction was found in growing cells and markedly neutralized in quiescent, differentiated cells. Therefore, a preference for proliferating and undifferentiated tumor cells can be inferred. This is a common property found in most anticancer drugs. However, Olomoucine and Roscovitine were able to circumvent the antiapoptotic effects of Bcl-2 and Bcl-XL proteins, two proven oncogenic factors that cause resistance to chemotherapy. In conclusion, Olomoucine, Roscovitine, and probably other related compounds display a promising profile as anticancer drugs, particularly, as we have just reported, in the treatment of neuroblastoma.

Acknowledgments

This work has been funded by “Paeria de Lleida” (“Ajuts a la recerca”, 1998) and University of Lleida

(“Programa de Grups Emergents”, 2001). J. Ribas is a predoctoral fellow from DGR (“Generalitat de Catalunya”). We thank V.J. Yuste and C. Casas for critical reading of the manuscript. We thank J.X. Comella for making easier the start of the Molecular Pharmacology Group. We thank J. Esquerda and E. Herrero for continued support. We are greatly indebted to N. Agell for scientific discussion, encouragement, and support.

References

- [1] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (2002) 1912–1934.
- [2] C. Norbury, P. Nurse, Animal cell cycles and their control, *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 441–470.
- [3] I.R. Hardcastle, B.T. Golding, R.J. Griffin, Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 325–348.
- [4] M. Knockaert, P. Greengard, L. Meijer, Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 417–425.
- [5] E.A. Sausville, Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) S32–S37.
- [6] J. Vesely, L. Havlicek, M. Strnad, J.J. Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D.S. Letham, J. Kato, L. Detivaud, S. Leclerc, L. Meijer, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 771–786.
- [7] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P.J. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, J.P. Molinoux, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 527–536.
- [8] M.D. Garrett, A. Fattaey, CDK inhibition and cancer therapy, *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1999) 104–111.
- [9] V.J. Yuste, I. Sanchez-Lopez, C. Sole, M. Encinas, J.R. Bayascas, J. Boix, J.X. Comella, The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells, *J. Neurochem.* 80 (2002) 126–139.
- [10] V. Cryns, J. Yuan, Proteases to die for, *Genes Dev.* 12 (1998) 1551–1570.
- [11] N.A. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312–1316.
- [12] E.S. Alnemri, D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, J. Yuan, Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell* 87 (1996) 171.
- [13] U. Fischer, R.U. Jänicke, K. Schulze-Osthoff, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 76–100.
- [14] A. Ashkenazi, V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 (1998) 1305–1308.
- [15] J.M. Adams, S. Cory, Apoptosomes: engines for caspase activation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (1998) 715–720.
- [16] J.M. Adams, S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281 (1998) 1322–1326.
- [17] J. Boix, N. Llecha, V.J. Yuste, J.X. Comella, Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines, *Neuropharmacology* 36 (1997) 811–821.
- [18] V.J. Yuste, J.R. Bayascas, N. Llecha, I. Sanchez-Lopez, J. Boix, J.X. Comella, The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22323–22331.

- [19] M. Encinas, M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Ceña, C. Gallego, J.X. Comella, Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells, *J. Neurochem.* 75 (2002) 991–1003.
- [20] J.T. Wolfe, J.H. Pringle, G.M. Cohen, Assays for the measurement of DNA fragmentation during apoptosis, in: T.G. Cotter, S.J. Martin (Eds.), *Techniques in Apoptosis*, Portland Press, London, 1996, pp. 51–69.
- [21] M. Piqué, M. Barragán, M. Dalmau, B. Bellosillo, G. Pons, J. Gil, Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome *c* release, *FEBS Lett.* 480 (2000) 193–196.
- [22] M. Knockaert, P. Lenormand, N. Gray, P. Schultz, J. Pouyssegur, L. Meijer, p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol, *Oncogene* 21 (2002) 6413–6424.
- [23] J. Egea, C. Espinet, R.M. Soler, S. Peiró, N. Rocamora, J.X. Comella, Nerve Growth Factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca²⁺ and calmodulin, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 1931–1946.
- [24] T.V. Achenbach, R. Muller, E.P. Slater, Bcl-2 independence of flavopiridol-induced apoptosis. Mitochondrial depolarization in the absence of cytochrome *c* release, *J. Biol. Chem.* 275 (2002) 32089–32097.
- [25] C. Pepper, A. Thomas, T. Hoy, C. Fegan, P. Bentley, Flavopiridol circumvents Bcl-2 family mediated inhibition of apoptosis and drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 114 (2001) 70–77.
- [26] S. Wittmann, P. Bali, S. Donapaty, R. Nimmanapalli, F. Guo, H. Yamaguchi, M. Huang, R. Jove, H.G. Wang, K. Bhalla, Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis, *Cancer Res.* 63 (2003) 93–99.
- [27] C. Yu, M. Rahmani, Y. Dai, D. Conrad, G. Krystal, P. Dent, S. Grant, The lethal effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors in human leukemia cells proceed through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent process, *Cancer Res.* 63 (2003) 1822–1833.
- [28] Y. Dai, P. Dent, S. Grant, Induction of apoptosis in human leukemia cells by the CDK1 inhibitor CGP74514A, *Cell Cycle* 1 (2002) 142–143.
- [29] K.F. Ferri, G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) E255–E263.
- [30] D.S. O'Connor, D. Grossman, J. Plescia, F. Li, H. Zhang, A. Villa, S. Tognin, C. Marchisio, D.C. Altieri, Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13103–13107.
- [31] K.C. Bible, S.H. Kaufmann, Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 4856–4861.
- [32] J. Boix, J. Fibla, V.J. Yuste, J.M. Piulats, N. Llecha, J.X. Comella, Serum deprivation and protein synthesis inhibition induce two different apoptotic processes in N18 neuroblastoma cells, *Exp. Cell Res.* 238 (1998) 422–429.
- [33] R.R. Ratan, T.H. Murphy, J.M. Baraban, Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione, *J. Neurosci.* 14 (1994) 4385–4392.
- [34] M. Polymenis, E.V. Schmidt, Coupling cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast, *Genes Dev.* 11 (1997) 2522–2531.
- [35] D.D. Hall, D.D. Markwardt, F. Parviz, W. Heideman, Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 17 (1998) 4370–4378.
- [36] G. Gil-Gomez, A. Berns, H.J. Brady, A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis, *EMBO J.* 17 (1998) 7209–7218.
- [37] A. Hakem, T. Sasaki, I. Kozieradzki, J.M. Penninger, The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 957–968.
- [38] D.S. Park, S.E. Farinelli, L.A. Greene, Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 8161–8169.
- [39] J. Padmanabhan, D.S. Park, L.A. Greene, M.L. Shelanski, Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis, *J. Neurosci.* 19 (1999) 8747–8756.
- [40] P. Golstein, D.M. Ojcius, D.-E. Young, Cell death mechanisms and the immune system, *Immunol. Rev.* 121 (1991) 29–63.
- [41] B. Dallaporta, M. de Pablo, C. Maisse, E. Daugas, M. Loeffler, N. Zamzani, G. Kroemer, Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis, *Cell Death Differ.* 7 (2000) 368–373.
- [42] R.N. Pittman, S. Wang, A.J. DiBenedetto, J.C. Mills, A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death, *J. Neurosci.* 13 (1993) 3669–3680.
- [43] J.B. Schulz, M. Weller, T. Klockgether, Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species, *J. Neurosci.* 16 (1996) 4696–4706.
- [44] C.B. Matranga, G.I. Shapiro, Selective sensitization of transformed cells to Flavopiridol-induced apoptosis following recruitment to S-Phase, *Cancer Res.* 62 (2002) 1707–1717.
- [45] M. Knockaert, L. Meijer, Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 819–825.
- [46] D.J. Davido, D.A. Leib, P.A. Schaffer, The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits the transactivating activity and alters the posttranslational modification of herpes simplex virus type 1 ICP0, *J. Virol.* 76 (2002) 1077–1088.
- [47] M. Ljungman, M.T. Paulsen, The cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382, *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 785–789.

8.2 ARTICLE 2.

Caspase 8/10 are not mediating apoptosis in neuroblastoma cells treated with CDK inhibitory drugs**Judit Ribas¹, Xavier Gomez-Arbones² and Jacint Boix¹#**

Molecular Pharmacology Laboratory, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques¹ and Departament de Medicina², Facultat de Medicina, Universitat de Lleida. C/ Montserrat Roig, 2.25008-Lleida. Catalunya. SPAIN.

#Corresponding author:

Jacint Boix MD PhD

Mol.Pharmacol. Lab., DCMB

Univ. of Lleida School of Med.

C/ Montserrat Roig, 2

25008-Lleida, SPAIN

Tel: +34 973702404

FAX: +34 973702426

E-mail: jacint.boix@cmb.udl.es

ABSTRACT

Olomoucine and Roscovitine are pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) displaying a promising profile as anticancer agents. Both compounds are effective inducers of apoptosis in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. The characterization of this process had suggested the involvement of an extrinsic pathway (Ribas and Boix, 2004), which depends on Caspase 8 or Caspase 10 activation. However, Caspase 8/10 are not expressed in SH-SY5Y because of gene silencing. Upon Olomoucine or Roscovitine treatment, no re-expression of Caspase 8/10 has been found. Therefore, in SH-SY5Y cells, this type of drugs are not triggering a canonical, Caspase 8/10-mediated, extrinsic apoptotic pathway.

Key words: Olomoucine, Roscovitine, Caspases, SH-SY5Y, Jurkat.

1. Introduction

Olomoucine and Roscovitine are CDK drugs with an inhibitory effect on cyclin-dependent kinases (CDK). They are characterized by inhibiting CDK1, CDK2 and CDK5, but not CDK4 and CDK6. As a consequence, both compounds stop cell cycle and cell proliferation. In addition, apoptosis is also induced in many cell types. These cellular effects oppose neoplastic development and, as a consequence, neoplasia becomes an obvious target for these drugs (Knockaert et al., 2002).

Little is known about the cellular events connecting drug-induced CDK dysfunction and apoptosis. In order to investigate these events, we have characterized the apoptotic process triggered by Olomoucine (200 μ M) and Roscovitine (50 μ M) in SH-SY5Y cells (Ribas and Boix, 2004). Our results have suggested the possibility of apoptosis being initiated at a membrane death receptor (Fas-like) and being transmitted by Caspase 8/10. However, CASP8 and CASP10 proteins are not expressed in SH-SY5Y cells because of gene silencing due to DNA methylation (Eggert et al., 2001). Therefore, we hypothesized Olomoucine and Roscovitine could be inducing the re-expression of Caspase 8 or Caspase 10, thus triggering apoptosis from an undetermined death receptor. By means of Western blot studies and, particularly, by a kinetic analysis of Caspase 8/10 activation, this hypothesis has been ruled out.

2. Materials and Methods

Roscovitine and Iso-Olomoucine were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Olomoucine was acquired from Tocris (Bristol, UK). zVADfmk (Catalog # N-1510) was supplied by Bachem (Bubendorf, Switzerland). CellTiter 96® kit, containing the MTS reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxy methoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt), was provided by Promega (Madison, WI, USA). Cell viability (%) was measured by the capability of cells in culture to reduce MTS. Cell death (%) = 100 - cell viability (%). SH-SY5Y cells were grown in DMEM medium supplemented with 2mM L-Glutamine. Jurkat cells were grown in RPMI medium. Final media contained 10(%) volume of fetal calf serum. The liquid media and the fetal calf serum were supplied by Invitrogen (Barcelona, Spain). Cell cultures were maintained in a 95(%) air, 5(%) CO₂, water saturated atmosphere at 37°C. Drugs were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) to provide the stock solutions of Olomoucine (50mM), Iso-Olomoucine (50mM), Roscovitine (20mM) and zVADfmk (20mM). From the stock solutions, drugs were added to the cultures at the final concentrations reported in the text and figures. Anti-Fas (human, activating), clone CH11, monoclonal antibody was supplied by Upstate biotechnology (Charlottesville, VA, USA) and used at the final concentrations further reported.

Cells extracts for Western blot analysis were performed as follows. Cells were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) at 4°C and lysed with a lysis-buffer containing 1% Nonidet P-40 in 50 mM Tris/HCl (pH 7.2), 5mM EDTA, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 2 g/ml Aprotinin, 1 ?g/ml Leupeptin and 1 ?g/ml Pepstatin. Pellets were gently disrupted by pipetting and extraction let to proceed

on ice for 5 min. Following a centrifugation at 0°C and 12000g for 15 min, a clear supernatant devoid of nuclei was obtained. Protein concentration was determined by means of the DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA) and equal protein loads were subjected to electrophoresis in 12% polyacrylamide gels. Then, proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) by means of a MINI trans-blot module from BioRad. Membranes were reacted with the following antibodies: Anti-Caspase 8 (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Catalog # AM46T) from Oncogene Research Products (San Diego, CA, USA); Anti-Caspase 10 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Catalog # M059-3) from MBL (Woburn, MA, USA); Anti-Tubulin (1: 2000 dilution; Catalog # T5168) from Sigma (St. Louis, MO, USA). Secondary peroxidase conjugated antibodies were also from Sigma. Immunoblots were finally developed by means of the SuperSignal® West Dura reagent from Pierce (Rockford, IL, USA).

The kinetics and extent of effector caspase activation (Caspase 3 and Caspase 7) was determined by the proteolysis of AcDEVDafc (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-(trifluoromethyl) coumarin), a fluorogenic substrate measuring DEVDase activity. Assays on cultured cells in 96 multiwell plates were performed as we have reported before (Yuste et al., 2001; Ribas and Boix, 2004). The same procedure was applied to quantify the proteolysis of AcIETDafc (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-(trifluoromethyl) coumarin), a fluorogenic substrate for either Caspase 8 or Caspase 10 (IETDase activity). AcDEVDafc and AcIETDafc were obtained from Enzyme Systems Products (Livermore, CA, USA).

3. Results

In order to test if Olomoucine (200 μM) or Roscovitine (50 μM) were inducing apoptosis through the re-expression of Caspase 8 or Caspase 10 in SH-SY5Y cells, our first approach was to characterize the content of Caspase 8 and Caspase 10 zymogens in these cells facing these drugs. At 9 h of treatment most cells are either apoptotic or committed to apoptosis, this fact defined the time course shown in Fig. 1. Even when films were overexposed, no band compatible with Caspase 8 zymogen was detected. Concerning Caspase 10 zymogen detection, the lack of specificity of some commercial antibodies had been reported (Kischkel et al., 2001). We tested some of those reported as specific and, indeed, they usually were in Jurkat extracts but not in SH-SY5Y ones (Fig. 1). However, despite of the background, no band with the mobility expected for Caspase 10 zymogen was found. We wondered if the activation by proteolysis of the zymogens could mask the re-expression of Caspase 8/10. To control this event, we repeated the time course analysis in the presence of 100 μM zVADfmk, a general inhibitor of caspases. As seen in Fig. 1, the presence of zVADfmk made no difference. In conclusion, neither Caspase 8 nor Caspase 10 seemed to be re-expressed upon Olomoucine or Roscovitine treatments.

To better support this result, we decided to perform an alternative approach, the kinetic analysis of caspase activation by these drugs (Fig. 2). Caspase 8 and Caspase 10 share very similar affinities towards the aminoacids they target. The motif IETD is cleaved by both enzymes. As a consequence, the cleavage

and a fluorescent fluorochrome release from the synthetic peptide Ac-IETD-afc, provides a method to detect and quantify Caspase 8/10 activation (IETDase activity). Analogously, Caspase 3 and Caspase 7 show a similar affinity for the motif DEVD. Both are known to be effector caspases placed downstream of the apoptotic cascade of caspase activation. As a consequence, the fluorescence released by the cleavage of the synthetic peptide AcDEVDafc measures the activation of these effector caspases (DEVDase activity). In addition, it indicates that apoptosis is taking place in the cell culture.

We proceeded to determine IETDase and DEVDase activities in SH-SY5Y cell cultures treated with either Olomoucine (200 μ M) or Roscovitine (50 μ M). As shown in Fig. 2, apoptosis and DEVDase activity increased in a time-dependent manner while IETDase activity was absent. As a negative control, we assayed Iso-Olomoucine (200 μ M), an inactive isomer of Olomoucine, and as expected IETDase and DEVDase activities remained at basal levels (not shown). SH-SY5Y cells were also treated with a Fas activating antibody (CH11 clone). Different antibody concentrations were tested up to 250 ng/ml and neither IETDase nor DEVDase activities were seen (Fig. 2).

In order to control the specificity of our approach and the activity of the CH11 antibody, Jurkat cells were studied. Jurkat cells are known to possess a functional Fas system that induces apoptosis upon stimulation by this antibody. As seen in Fig. 2, Caspase 8/10 dependent IETDase activity was already elevated at 6 h and decayed at 24 h, a time characterized by a prominent cell destruction in the Jurkat culture. This result was consistent with the DEVDase activity profile from effector caspases, placed downstream of Caspase 8/10. In these cells, we thought of exploring the effects of Olomoucine (200 μ M) and Roscovitine (50 μ M). We found the profile of IETDase activity paralleling that of DEVDase one. Both activities increased in a time-dependent manner, thus emphasizing the near to zero value of the IETDase activity displayed by SH-SY5Y cells under the same treatment. In conclusion, Olomoucine and Roscovitine induce apoptosis in SH-SY5Y without Caspase 8/10 involvement.

In each experiment, the extent of cell death induced by a 24 h treatment was controlled by means of the MTS reduction assay. The ratios of cell death obtained in SH-SY5Y were: 58.8 ± 8.8 % for Olomoucine, 46.7 ± 8.4 % for Roscovitine and 5.5 ± 1.5 % for CH11 antibody. In Jurkat cells, the ratios were: 59.6 ± 19.7 %, 61.3 ± 9 % and 70.5 ± 4.5 % respectively. The values are the mean S.E.M. from the experiments comprised in Fig. 2 and were consistent with those expected (Ribas and Boix, 2004).

4. Discussion

In this report, we have used two independent methods to demonstrate the null implication of Caspase 8 and Caspase 10 in the apoptotic pathways triggered by Olomoucine and Roscovitine in SH-SY5Y cells. In humans, Caspase 8 and Caspase 10 are constitutive elements of the apoptotic pathways initiated at cell membranes by death receptors, the so called extrinsic pathways (Ashkenazi and Dixit, 1998). Therefore, the activation of a canonical, Caspase 8/10-mediated, extrinsic pathway is not the mode of

action of two distinct CDK inhibitory drugs in a paradigmatic neuroblastoma cell line. The procedure to determine caspase activation has been devised to be applied to multiwell plates (Yuste et al., 2001). As a consequence, pharmacological approaches envisaging multiple simultaneous determinations are easily performed. However, the specificity of fluorogenic peptide substrates has been questioned. To be conclusive, we believe a negative control like Iso-Olomoucine for Olomoucine is required. To assess specificity, we suggest to use a positive control of the caspase activation subjected to study. Jurkat cells and CH11 antibody have provided the positive control of Caspase 8/10 activation in our experiments. Moreover, Jurkat cells have also generated new information. First, Olomoucine and Roscovitine are effectively inducing apoptosis in this lymphoid cell line. Second, these drugs are activating Caspase 8/10 and, therefore, their involvement cannot be ruled out in these cells. However, Caspase 8 has been reported to be activated downstream of Caspase 3 (Slee, et al., 1999). Therefore, Caspase 8/10 could merely be amplifying and not triggering the caspase cascade in Jurkat cells. In conclusion, Caspase 8/10 implication in apoptosis triggered by Olomoucine and Roscovitine in Jurkat cells can be a matter of discussion and future research however, as emphasized before, it can be definitively discarded in SH-SY5Y cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by “Instituto de Salud Carlos III” (PI041488, 2005-2007), Spain. X.G.-A. thanks University of Lleida (Programa de Grups Emergents, 2002) for financial support. J.R. is presently a predoctoral fellow from “Fundació Dr. Pifarré” (Hospital Univ. Arnau de Vilanova, Lleida).

REFERENCES

- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Eggert, A., Grotzer, M.A., Zuzak, T.J., Wiewrodt, B.R., Ho, R., Ikegaki, N., Brodeur, G.M., 2001. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* 61, 1314-1319.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A., 2001. Death receptor recruitment of endogenous Caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of Caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276, 46639-46646.
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L., 2002. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 417-425.
- Ribas, J., Boix, J., 2004. Cell differentiation, caspase inhibition, and macromolecular synthesis blockage, but not Bcl-2 or Bcl-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs. *Exp. Cell Res.* 295, 9-24.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.-G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292.
- Yuste, V.J., Bayascas, J.R., Llecha, N., Sanchez-Lopez, I., Boix, J., Comella, J.X., 2001. The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 276, 22323-22331.

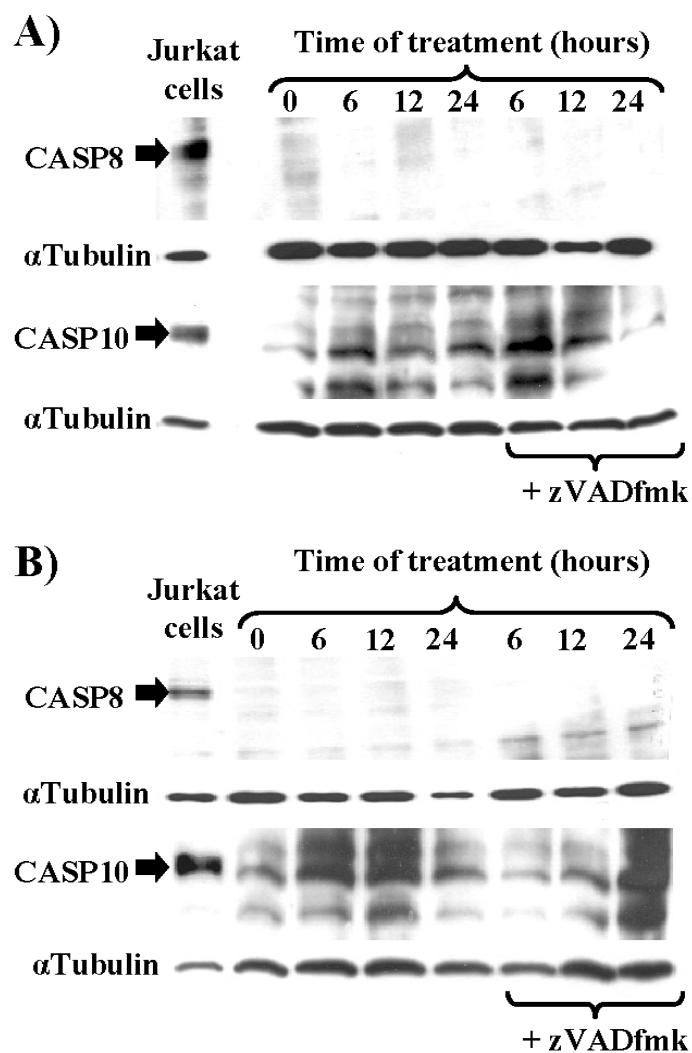


Figura 8.3. Olomoucine and Roscovitine do not trigger Caspase 8/10 zymogen expression in SH-SY5Y cells. A) SH-SY5Y cells were treated with 200 μ M Olomoucine for the times stated in the figure. Then, proteins were extracted and analyzed by Western Blot with primary antibodies against Caspase 8, Caspase 10 and Tubulin (in order to control the amount of protein loaded per lane). B) SH-SY5Y cells were also treated with 50 μ M Roscovitine and processed as described before. Note that some cells were simultaneously treated with zVADfmk (100 μ M) in order to prevent zymogens to undergo autoproteolysis or proteolysis mediated by other caspases. Extracts from Jurkat cells were used as positive controls.

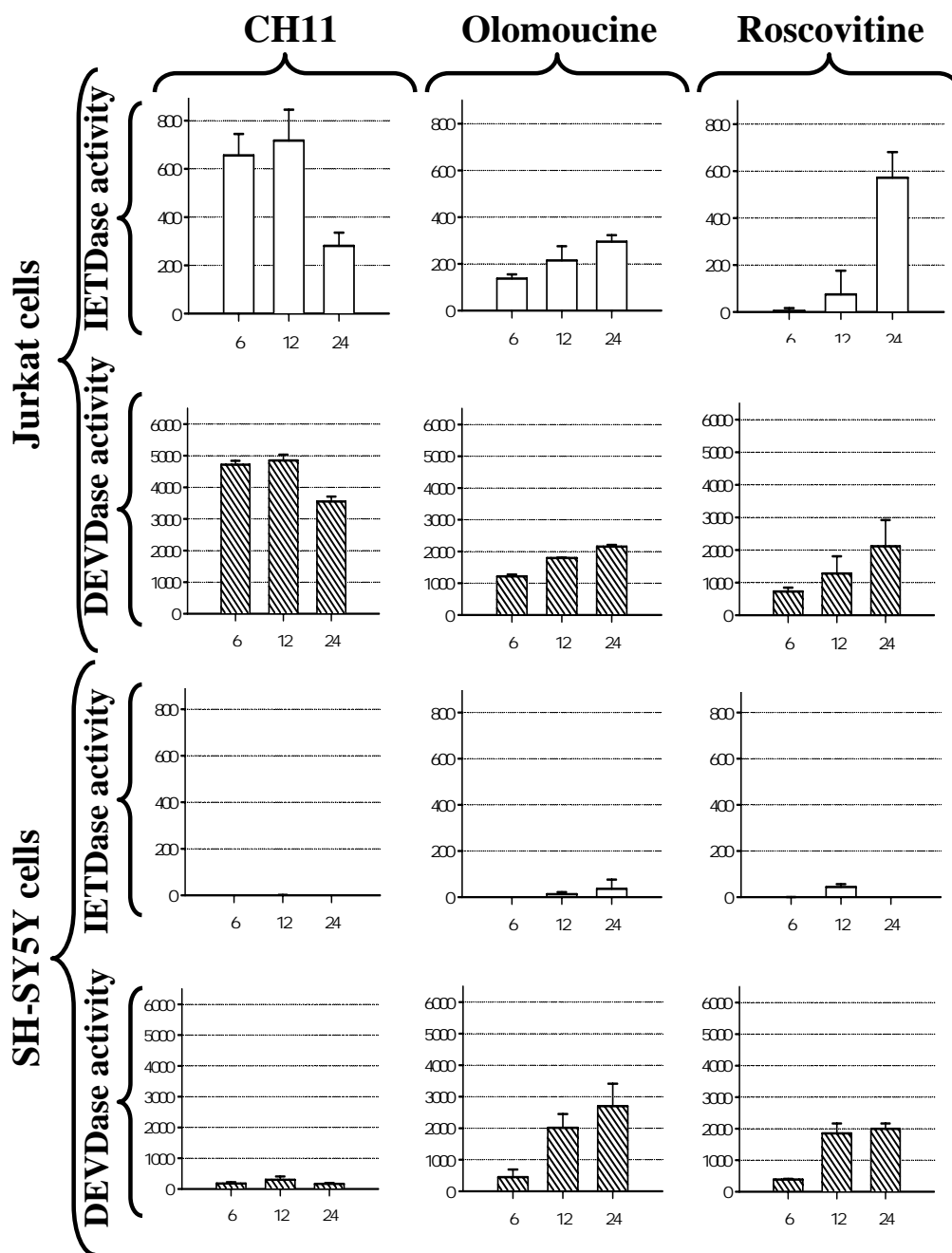


Figura 8.4. Olomoucine and Roscovitine do not trigger caspase 8/10 proteolytic activity in SH-SY5Y cells. Fluorogenic substrates of Caspase 8/10 (AcIETDafc) and effector Caspase 3/7 (AcDEVDafc) were used to determine the activation kinetics of these enzymes in SH-SY5Y and Jurkat cells treated with CH11 antibody (250 ng/ml), Olomoucine (200 μ M) and Roscovitine (50 μ M). Jurkat cells treated with the CH11 antibody were used as a positive control of Caspase 8/10 activation. The x axis is the time (h) elapsed after the treatment. The y axis is proteolytic activity measured in arbitrary fluorescent units. The bar value is the mean S.E.M. of two independent experiments with four independent determinations per experiment.

8.3 ARTICLE 3.

**DOUBTFUL RELEVANCY OF THE ERK1/2 PHOSPHORYLATION CAUSED BY CDK INHIBITORY
DRUGS**

Judit Ribas¹, Judit Cirera¹, Xavier Gomez-Arbones² and Jacint Boix^{1†}

Molecular Pharmacology Laboratory, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques¹ and Departament de Medicina², Facultat de Medicina, Universitat de Lleida.

C/ Montserrat Roig, 2. 25008-Lleida. Catalunya. SPAIN.

†Corresponding author:

Jacint Boix MD PhD

Mol. Pharmacol. Lab., DCMB

Univ. of Lleida, School of Med.

C/ Montserrat Roig, 2

25008-Lleida, SPAIN

Tel: +34 973702404

FAX: +34 973702426

E-mail: jacint.boix@cmb.udl.es

ABSTRACT

Olomoucine and Roscovitine induce the phosphorylation and subsequent activation of ERK1/2 proteins. Iso-olomoucine, an inactive isomer of Olomoucine, caused the same effect in our cell model, SH-SY5Y. Based mainly on Iso-olomoucine results, we concluded that no correlation existed between drug-induced ERK1/2 phosphorylation and CDK inhibition, cell proliferation or cell differentiation phenomena. Moreover, Iso-olomoucine treatment caused ERK1/2 phosphorylation but neither apoptosis nor any obvious cell toxicity was detected. In conclusion, we suggest ERK1/2 phosphorylation should be regarded as a side effect of this type of drugs, a side effect without a clear functional consequence on cells in culture. On the other hand, active CDK inhibitory drugs caused cyclin D1 loss at concentrations known to trigger apoptosis in SH-SY5Y cells. We have found cyclin D1 decay was correlating that of β -catenin one, a protein characterized by being a caspase substrate and a transcriptional regulator of Cyclin D1.

Keywords: Olomoucine, Roscovitine, CDK, ERK, cyclin D1, β -catenin, apoptosis, SH-SY5Y

INTRODUCTION

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are known to orchestrate the ordered succession of cell cycle phases in normal as well as in neoplastic cells. CDK activation has been implicated in cancer, neurodegenerative diseases, progression of viral infection, autoimmune glomerulonephritis, etc. Therefore, CDK inhibitory drugs are envisaged as promising agents to treat such diverse disorders [1]. Targeting the ATP-binding pocket of CDKs has been a fruitful approach to design many of such drugs, displaying quite distinct chemical structures. Olomoucine and Roscovitine are two CDK inhibitory drugs characterized by being 2,6,9-trisubstituted purines [2]. Both compounds show "in vitro" specificity for inhibiting CDK1, CDK2 and CDK5. Their effects on cell cycle and cell proliferation have been well characterized and are consistent with those expected from the inhibition of CDK1 and CDK2 [3-5].

CDK inhibitory drugs are also effective inducers of apoptosis in many cell types. Roscovitine, for instance, has caused apoptosis in human cells derived from breast cancer [6,7], head and neck squamous carcinoma [8], chronic lymphocytic leukemia [9] and neuroblastoma [10]. Data concerning how these drugs trigger apoptosis, are quite scattered and far from defining a common and consistent scheme. Finally, Olomoucine and Roscovitine are also capable of inducing cell differentiation but the mechanisms remain mostly hypothetical [11-13].

Extracellular-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) had been described as a secondary target for this type of compounds and their putative inhibition was a fact to be envisaged when characterizing the cellular effects of CDK inhibitory drugs [14,15]. Unexpectedly, the increased phosphorylation and subsequent activation of ERK proteins in response to CYC202 (R-Roscovitine), Olomoucine and other related compounds was reported in HT29 and KM12, two colon cancer derived cell lines. Upon CYC202 treatments, T29 and KM12 cells activated their ERK1/2 pathway, stopped cycling but did not undergo apoptosis [16]. These results prompted us to characterize ERK1/2 phosphorylation in our cell model, SH-SY5Y. These cells undergo apoptosis when challenged with Olomoucine and Roscovitine and we have characterized the process in detail [10]. In addition, SH-SY5Y cells can be differentiated in culture

conditions thus surpassing T29 and KM12 cells in the functional correlates to be studied. Furthermore, we thought of using Iso-olomoucine (Iso hereon). Iso is an Olomoucine isomer that displays a very low pharmacological potency at inhibiting CDKs [17]. As a consequence, Iso is not active in the range of Olomoucine concentrations causing CDK inhibition, cell cycle arrest or apoptosis.

We were surprised to find that Iso did not differ from Olomoucine and Roscovitine at increasing the phosphorylation of ERK1/2 proteins. However, as expected, Iso displayed neither cell lethality nor obvious cell toxicity, being cell proliferation and differentiation not influenced either by its presence. We further characterized some proteins implied in the regulation of cell cycle and apoptosis, like Rb and cyclin D1. Some molecular events related to apoptosis and cell cycle stop could be observed, however none correlated with the drug-induced ERK1/2 phosphorylation phenomenon.

MATERIALS and METHODS

SH-SY5Y is a cell line derived from a human neuroblastoma. SH-SY5Y cells were grown in DMEM medium supplemented with 2mM L-glutamine and a 10% volume of fetal calf serum. The liquid media and the fetal calf serum were supplied by Invitrogen (Barcelona, Spain). Cell cultures were maintained in a 95% air, 5% CO₂, water saturated atmosphere at 37°C. Along our experiments, cell cultures were periodically checked for mycoplasma contamination and were repeatedly negative by PCR assays. Culture dishes and other plastic disposable tools were supplied by Bibby Sterilin (Staffordshire, UK) and Iwaki (Asahi Techno Glass, Chiba, Japan). Roscovitine and Iso were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Olomoucine and *all-trans*-Retinoic Acid (RA) were acquired from Tocris (Bristol, UK). Olomoucine and Iso were dissolved in DMSO at a concentration 50mM. Roscovitine was prepared in DMSO at a concentration 20mM. Drugs were added to the cultures at the final concentrations reported in the text. In order to obtain differentiated SH-SY5Y cells, the culture was performed on collagen coated plates and the medium contained RA at a 10µM concentration. After 5 days cells had stopped to proliferate and displayed a prominent neurite outgrowth (See Fig. 4C).

The percentage of apoptotic cells in the cultures was determined by means of the terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling procedure (TUNEL) and flow cytometry. TUNEL was performed according to the In situ Cell Death Detection kit, Fluorescein, manual (Roche, Barcelona, Spain). The flow cytometer was an EPICS® XL unit from Coulter Científica, SA (Madrid, Spain).

Cell viability (%) was measured by the capability of cells to reduce the MTS reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxy methoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) provided in the CellTiter 96® kit from Promega (Madison, WI, USA). The assays were performed as we have reported [10]. The ratios of cell death were calculated as follows: Cell death (%) = 100 - cell viability (%).

Cell number was determined in the cultures by means of a Z2 particle counter from Coulter Científica, SA (Madrid, Spain). Alternatively, the total LDH (lactate deshidrogenase) released by cell lysis provided an estimation of the cell mass in the culture. Cell lysis was the result of adding Triton X-100 (0,9% final concentration) to the culture medium. The reagents and the protocol to quantify LDH activity was provided with the Cytotox 96® kit from Promega (Madison, WI, USA). The final concentration for Iso was 200µM. At this concentration, the drug vehicle (DMSO) reached its maximum value, 0,4%. Therefore, this was the DMSO concentration employed in the control experiments that set the maximal rate of cell proliferation (100%). To detect if any significant differences existed between DMSO and Iso treatments, the Student's t-test for independent groups was applied.

To study ERK1/2 proteins, cells were first detached from the culture plates, washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) at 4°C and lysed in a buffer containing 1% Nonidet P-40, 20mM Tris/ClH pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 20mM NaF, 40mM β-glycerophosphate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin and 1µg/ml Pepstatin. Pellets were gently disrupted by pipetting and extraction led to proceed on ice for 5 minutes. Following a centrifugation at 0°C and 12000 g for 15 minutes, a clear supernatant devoid of nuclei was obtained. To study the proteins located at the nucleus, cells were lysed in 2% SDS (Laemmli's buffer), boiled for 2 minutes and sonicated to get a fluid extract. Irrespective of the extract type and in order to

load an equal amount of protein per electrophoretic lane, protein concentration was calculated by means of the DC Protein Assay from BioRad (Hercules, CA, USA). Electrophoresis in 10-12% polyacrylamide gels were performed and proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were then reacted with the following antibodies: Anti-panERK (Catalog # 610123) and anti-Rb (Catalog # 554136) were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA); anti-phosphoERK (Catalog # 9101S) was from Cell Signaling (Beverly, MA, USA); anti-PARP (Catalog # MAB3290) was provided by Chemicon (Temecula, CA, USA). Anti-cyclin D1 (Catalog # sc-718) and anti- β -catenin (Catalog # sc-7199) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Finally, anti- α Tubulin (Catalog # T5168) and secondary peroxidase conjugated antibodies were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Immunoblots, were developed by means of the SuperSignal® chemiluminiscent reagents from Pierce (Rockford, IL, USA).

RESULTS

Iso-olomoucine treatment induced Erk1/2 phosphorylation.

Following a treatment with Olomoucine (200 μ M) or Roscovitine (50 μ M), we detected an increased phosphorylation of ERK1/2 in SH-SY5Y cells. However, we also characterized the effects of Iso (200 μ M) in our experiments. At this concentration, Iso has proved not to inhibit CDKs [17] and becomes the optimal negative control of Olomoucine actions, as will be further assessed by comparing the phosphorylation state of Rb protein (Fig. 5). Surprisingly, concerning ERK1/2 phosphorylation, Iso did not differ from their active counterpart drugs. Iso was also increasing the phosphorylation of ERK1/2 proteins (Fig. 1). As shown, this was not an effect derived from the DMSO vehicle and its extent was in the range of the Roscovitine one, following a 24h treatment. On the other hand, the phosphorylation of ERK1/2 was reduced in Olomoucine treated cells when compared to their Iso or Roscovitine counterparts. This seemed to be caused by a different kinetics of the phenomenon, as already reported [16]. The maximum of ERK1/2 phosphorylation was found at a 12h time in Olomoucine-treated cells (not

shown). This fact notwithstanding, the extent of ERK1/2 phosphorylation seen in the Olomoucine lane continued to be higher than the one displayed by controls (Fig. 1). In conclusion, the increase of ERK1/2 phosphorylation is an effect detected in this type of drugs that can be dissociated from their CDK inhibitory activity.

Iso-olomoucine treatment did not induce either cell death or apoptosis.

Based on the previous results, we proceeded to re-evaluate the cell toxicity associated to the Iso-treatments in SH-SY5Y cells. Our first approach was to test the cell ability to reduce MTS, this is a very early and sensitive assay to detect metabolic stress and death in cell cultures (Fig. 2A). No cell death was detected in SH-SY5Y cells cultured for 24h in the presence of Iso (200 μ M). This fact contrasted with the cell death detected in parallel cultures treated with Olomoucine (200 μ M) or Roscovitine (50 μ M). We knew Olomoucine and Roscovitine induced apoptosis in these cells. Therefore, we proceeded to measure the percentage of apoptotic cells in the cell cultures by means of the TUNEL plus flow cytometry procedures (Fig. 2B). In conclusion, the increased ERK1/2 phosphorylation triggered by these drugs was not determining any lethality in SH-SY5Y cells.

Iso-olomoucine effects on cell proliferation.

It is generally accepted that the increased phosphorylation and consequent activation of the ERK1/2 proteins translates frequently into changes of the cell proliferation status. In addition, mild cell toxicity can be detected as a subtle decrease in cell proliferation. Taking together both facts, we proceeded to characterize if Iso (200 μ M) had any effect on the proliferation of SH-SY5Y cells in culture. We followed two different approaches to quantify the number of cells in culture. First, cell counting was directly performed by means of a Z2 cytometer (Fig. 3A). Second, total LDH measurements were obtained as an estimation of total cell mass (Fig. 3B). As shown, no significant effect on cell proliferation was

detected when Iso-treated cells were compared with vehicle-treated ones (0.4% DMSO). In conclusion, Iso-induced ERK1/2 phosphorylation was not affecting SH-SY5Y cell proliferation.

Iso-olomoucine effects on cell differentiation.

Finally, we thought of the possibility of ERK1/2 activation being involved in differentiation phenomena. SH-SY5Y cells can be differentiated in culture conditions by applying the protocol described in the methods section. Neuronal differentiation can be easily identified by a cell phenotype, characterized by a prominent neurite outgrowth (Fig. 4C). In addition, differentiation implies that cells stop proliferating and, as a consequence, saturation of the culture plates is not reached. Following a treatment with Iso (200 μ M), as reported above, cells did not stop proliferating. Cultures began to be saturated after 48h and neuritogenesis was not observed (Fig. 4B). This was consistent with our previous findings about Olomoucine and Roscovitine not inducing SH-SY5Y cell differentiation [10]. Therefore, ERK1/2 phosphorylation induced by these drugs had no effect on induction of SH-SY5Y differentiation. However, the opposite effect had also to be tested. Instead of inducing cell differentiation, ERK1/2 phosphorylation could impair it. To test this possibility, SH-SY5Y were subjected to the differentiation protocol in the presence of Iso (200 μ M). No visible effect on neuritogenesis was detected (Fig. 4D). In addition, we looked at the cell cycle profile (S phase reduction) of differentiated SH-SY5Y cells in the presence of Iso. It did not differ from the one characteristic of control, differentiated cells, in the absence of Iso (not shown). In conclusion, in SH-SY5Y cells, two complementary approaches were suggesting Iso-induced ERK1/2 phosphorylation did not interfere with the differentiation processes.

The loss of cyclin D1 correlated with the loss of β -catenin and apoptosis in SH-SY5Y cells.

The loss of cyclin D1 is a molecular event described in cells treated with Olomoucine and Roscovitine [16]. We wondered if this loss was happening in our cell model, SH-SY5Y, facing these

drugs. We thought of interest to study in parallel, β -catenin protein, which is known to be a positive regulator of cyclin D1 transcription [18]. Because of its central role in cell cycle regulation and CDK substrate, Rb protein was also characterized. Finally, PARP (PolyADP-Ribose Polymerase) protein was analyzed as the most accepted indicator of caspase activation and apoptosis [19]. As expected from their CDK inhibitory activity, Olomoucine and Roscovitine reduced Rb phosphorylation. Consistently, inactive Iso did not. In addition, a fragment of Rb was detected in the cells undergoing apoptosis. Precisely, those treated with Olomoucine and Roscovitine, but not with Iso. This fragment has been described and is the result of caspase activation and apoptosis taking place [20]. This interpretation was reinforced by the parallel analysis of PARP and its typical fragmentation (Fig. 5).

Concerning cyclin D1, we found a neat decay only in the SH-SY5Y cells undergoing apoptosis. Interestingly, this decay occurred in simultaneously to that of β -catenin protein (Fig. 5). The fact that β -catenin is a transcriptional regulator of cyclin D1, was providing an explanation for cyclin D1 loss. To date cyclin D1 has not been demonstrated to be a substrate for caspase degradation [21], conversely β -catenin is a fully recognized one [22]. Therefore, in SH-SY5Y cells, loss of cyclin D1 could be related to β -catenin loss and the occurrence of apoptosis. In Iso-treated cells, ERK1/2 phosphorylation was increased, however neither cell death nor apoptosis was found, neither Rb nor PARP fragmentation were detected, and neither β -catenin nor cyclin D1 reductions were observed. In conclusion, the ERK1/2 phosphorylation effect did not correlate with any of these molecular events.

DISCUSSION

In this report we have detected an increased phosphorylation of ERK1/2 proteins in SH-SY5Y cells facing Olomoucine and Roscovitine. The same phenomenon had been previously described in two cell lines derived from colon cancer [16]. Therefore, this drug-induced effect was reproducible and no longer limited to a specific cell type. It could be now extended from an epithelial to a neuronal type of cancer cell. Surprisingly, the Iso compound was producing the same effect. It is known Iso does not inhibit

CDKs, if used in the same range of concentrations than Olomoucine [17]. This was verified by looking at Rb protein, which is subjected to CDK-mediated phosphorylations in the context of cell cycle regulation (Fig. 5). As expected, Olomoucine and Roscovitine were reducing Rb phosphorylation while Iso was not. Therefore, drug-induced CDK inhibition and ERK1/2 phosphorylation induction were dissociated. This was in agreement with what had been reported about Purvalanol A, an active CDK inhibitory drug, chemically related to Olomoucine and Roscovitine, but not an inductor of ERK1/2 phosphorylation at CDK inhibiting concentrations [16]. Taking together all the results, the induction of ERK1/2 phosphorylation could be considered a mere side effect present in some of these drugs. We wondered about the mechanism explaining this side effect. Olomoucine, Roscovitine and Iso could be activating phosphatases acting on the ERK1/2 pathway, however this seems not very probable if the chemical structure of these drug (purine derivatives) is considered. Alternatively, we thought of a protein kinase with a negative effect on ERK1/2 phosphorylation and activation. A kinase inhibited by Iso and Olomoucine in the same range of concentrations. A kinase subjected to inhibition by Roscovitine but not by Purvalanol A. We proceeded to check the profiles of kinase inhibition by these drugs, precisely the lists of their IC₅₀ available to us. Unfortunately, no kinase fulfilling our proposed requirements could be identified.

In a previous report we had discarded that Olomoucine and Roscovitine caused apoptosis through the inhibition of the ERK1/2 pathway. Two independent inhibitors of the pathway, PD98059 and UO126, caused no lethality in SH-SY5Y cells after 48h of treatment [10]. Olomoucine and Roscovitine were expected to inhibit the ERK pathway, surprisingly they activated it by increasing ERK1/2 phosphorylation [16]. Is this phenomenon relevant to the apoptotic mode of action of these drugs? We do not think so. First, it does not imply either apoptosis or any detectable cell toxicity, as demonstrated in the present study by characterizing the Iso compound effects. Second, it is not required for these drugs to induce apoptosis. As stated before, Purvalanol A is not inducing ERK1/2 phosphorylation and is quite equivalent to Olomoucine and Roscovitine at triggering apoptosis [23]. In Iso-treated SH-SY5Y

cells, when apoptosis is not occurring, the Iso-induced ERK1/2 phosphorylation does not translate into either increases or decreases of cell proliferation, either promotion or blockage of cell differentiation. In conclusion, this drug effect has either subtle or no implications on cell behavior and functions.

Reinforcing this assertion, drug-induced ERK1/2 phosphorylation displayed no molecular correlates. It was a phenomenon dissociated from Rb hypophosphorylation and cyclin D1 loss, supporting previous published results [16]. In addition, we extended the lack of correlation to the decay of β -catenin, unreported in previous Olomoucine and Roscovitine studies. Rb hypophosphorylation can be explained by the direct effect of these drugs on CDK, essentially CDK2. However, CDK4 and CDK6 inhibition will also result from cyclin D1 loss, indirectly. We propose the β -catenin decay to be caused by caspase degradation [21,22]. Being β -catenin a key regulator of cyclin D1 expression [18], this would provide a satisfactory explanation for cyclin D1 loss. Alternatively, CYC202 (R-Roscovitine) has been described to decrease the mRNA transcription and the cyclin D1 protein content in colon cancer cells not undergoing apoptosis [16]. Both mechanisms are surely complementary and should be considered when interpreting the cyclin D1 loss caused by these drugs.

In conclusion, CDK inhibitory drugs are new and promising agents for the treatment of cancer and other diseases. The triggering of ERK1/2 phosphorylation is found in some of these drugs as a side effect not derived from CDK inhibition. As a side effect, its clinical or therapeutic consequences cannot be presently forecasted. However, the lack of cytostatic, cytotoxic or cell differentiation actions associated with it, make this effect irrelevant envisaging the anticancer mode of action of these drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by "Instituto de Salud Carlos III" (PI041488, 2005-2007), Spain. X.G.-A. thanks University of Lleida (Programa de Grups Emergents, 2002) for financial support. J.R. is presently a predoctoral fellow from "Fundació Dr. Pifarré" (Hospital Univ. Aneu de Vilanova, Lleida).

REFERENCES

- [1] M. Knockaert, P. Greengard, L. Meijer, Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 417-425.
- [2] I.R. Hardcastle, B.T. Golding, R.J. Griffin, Designing Inhibitors of Cyclin-dependent kinases, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 325-348.
- [3] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcross, J.P. Moulinoux, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 527-536.
- [4] B. Schutte, L. Nieland, M. van Engeland, M.E.R. Henfling, L. Meijer, F.C.S. Ramaekers, The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor Olomoucine on cell cycle kinetics, *Exp. Cell Res.* 236 (1997) 4-15.
- [5] F. Alessi, S. Quarta, M. Savio, F. Riva, L. Rossi, L.A. Stivala, A.I. Scovassi, L. Meijer, E. Prosperi, The cyclin-dependent kinase inhibitors Olomoucine and Roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity, *Exp. Cell Res.* 245 (1998) 8-18.
- [6] O.P. Mgbonyebi, J. Russo, I.H. Russo, Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells, *Cancer Res.* 59 (1999) 1903-1910.
- [7] J. Wojciechowski, M. Horky, M. Gueorguieva, J. Wesierska-Gadek, Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 486-495.
- [8] M. Mihara, S. Shintani, A. Kiyota, T. Matsumura, D.T. Wong, Cyclin-dependent kinase inhibitor (roscovitine) suppresses growth and induces apoptosis by regulating Bcl-x in head and neck squamous cell carcinoma cells, *Int. J. Oncol.* 21 (2002) 95-101.
- [9] I.N. Hahntow, F. Schneller, M. Oelsner, K. Weick, I. Ringshausen, F. Fend, C. Peschel, T. Decker, Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells, *Leukemia* 18 (2004) 747-755.

-
- [10] J. Ribas, J. Boix, Cell differentiation, caspase inhibition and macromolecular synthesis blockage, but not Bcl-2 or Bcl-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs, *Exp. Cell Res.* 295 (2004) 9-24.
- [11] L. Nguyen, B. Malgrange, V. Rocher, G. Hans, G. Moonen, J.M. Rigo, S. Belachew, Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases control proliferation, apoptosis and differentiation of oligodendroglial cells, *Int. J. Dev. Neurosci.* 21 (2003) 321-326.
- [12] B. Malgrange, M. Knockaert, S. Belachew, L. Nguyen, G. Moonen, L. Meijer, P.P. Lefebvre, The inhibition of cyclin-dependent kinases induces differentiation of supernumerary hair cells and Deiters' cells in the developing organ of Corti. *FASEB J.* 17 (2003) 2136-2138.
- [13] F. Calegari, W.B. Huttner, An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis, *J. Cell Sci.* 15 (2003) 4947-4955.
- [14] M. Knockaert, P. Lenormand, N. Gray, P. Schultz, J. Pouyssegur, L. Meijer, p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol, *Oncogene* 21 (2002) 6413-6424.
- [15] M. Knockaert, L. Meijer, Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 819-825.
- [16] S.R. Whittaker, M.I. Walton, M.D. Garrett, P. Workman, The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-Roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of cyclin D1, and activates the Mitogen-activated protein kinase pathway, *Cancer Res.* 64 (2004) 262-272.
- [17] J. Vesely, L. Havlicek, M. Strnad, J.J. Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D.S. Letham, J. Kato, L. Detivaud, S. Leclerc, L. Meijer, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 771-786.
- [18] O. Tetsu, F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature* 398 (1999) 422-426.
- [19] Y.A. Lazebnik, S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, G.G. Poirier, W.C. Earnshaw, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371 (1994) 346-347.

- [20] R.U. Jänicke, P.A. Walker, X.Y. Lin, A.G. Porter, Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis, *EMBO J.* 15 (1996) 6969-6978.
- [21] U. Fischer, R.U. Janicke, K. Schulze-Osthoff, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 76-100.
- [22] U. Steinhilber, V. Badock, A. Bauer, J. Behrens, B. Wittman-Liebold, B. Dorken, K. Bommert, Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16345-16353.
- [23] E.A. Monaco, C.M. Beaman-Hall, A. Mathur, M.L. Vallano, Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1947-1964.

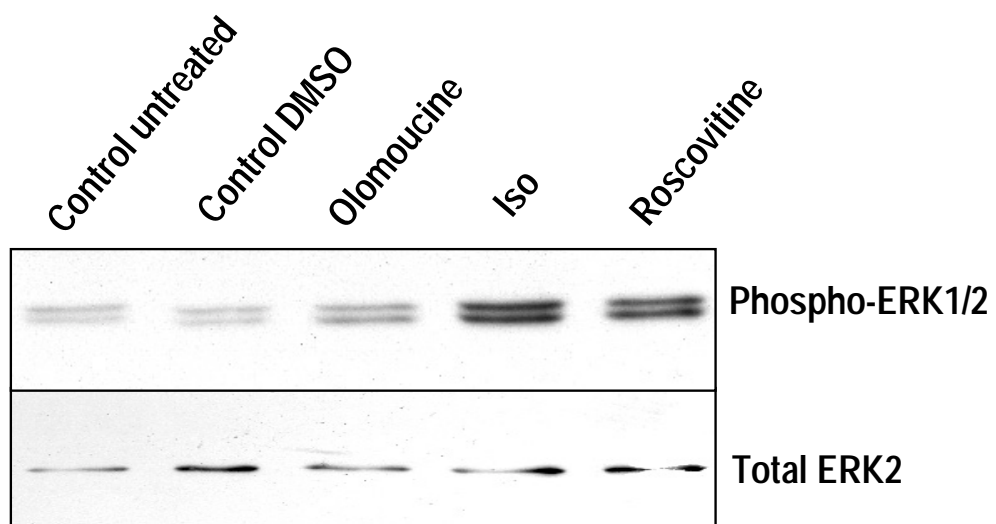
Fig. 1. Effects of Olomoucine, Iso and Roscovitine on ERK1/2 phosphorylation. SH-SY5Y cells were treated for 24h as indicated in the figure. Drug concentrations were 200 μ M for Olomoucine and Iso, 50 μ M for Roscovitine and 0,4% for DMSO. The total content of ERK2 is shown as a control of the amount of protein loaded by lane. This result has been reproduced in several independent experiments.

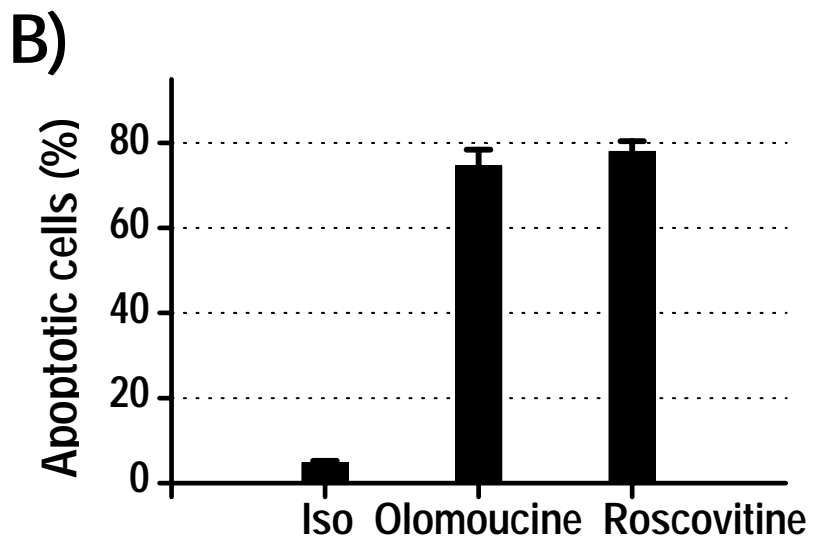
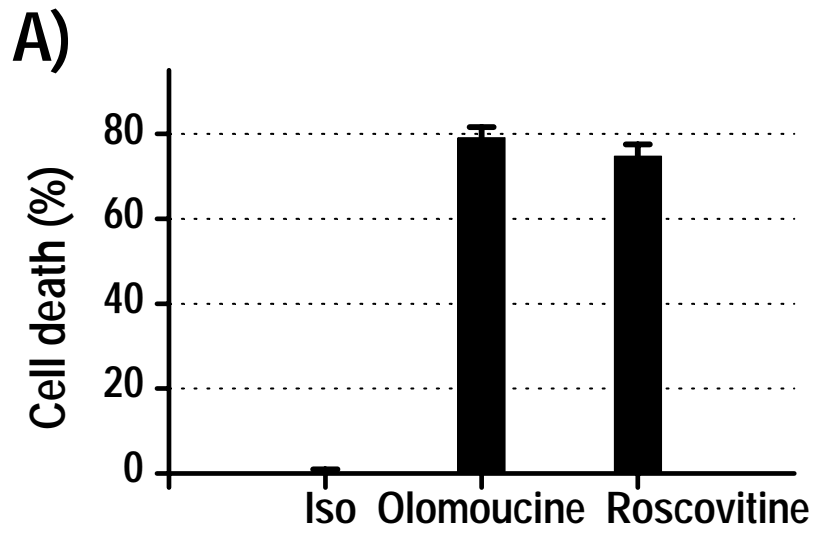
Fig. 2. SH-SY5Y cells were treated with Olomoucine and Iso (200 μ M) and Roscovitine (50 μ M). A) The percentage of cell death was determined by the MTS reduction assay after a 24h treatment. B) The percentage of apoptotic cells was obtained by flow cytometry of TUNEL processed cells after being treated for 48h. Bar values are the mean \pm S.E.M. of at least three separately treated-cultures in two independent experiments.

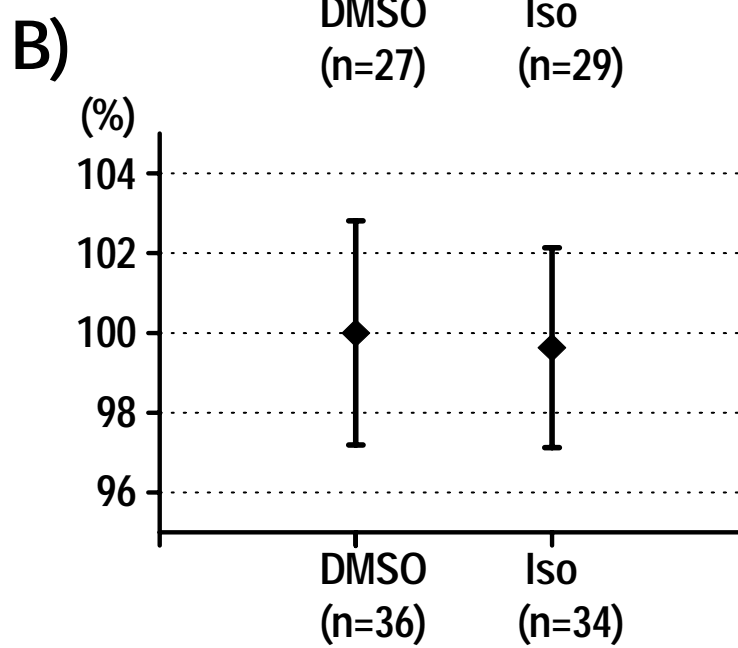
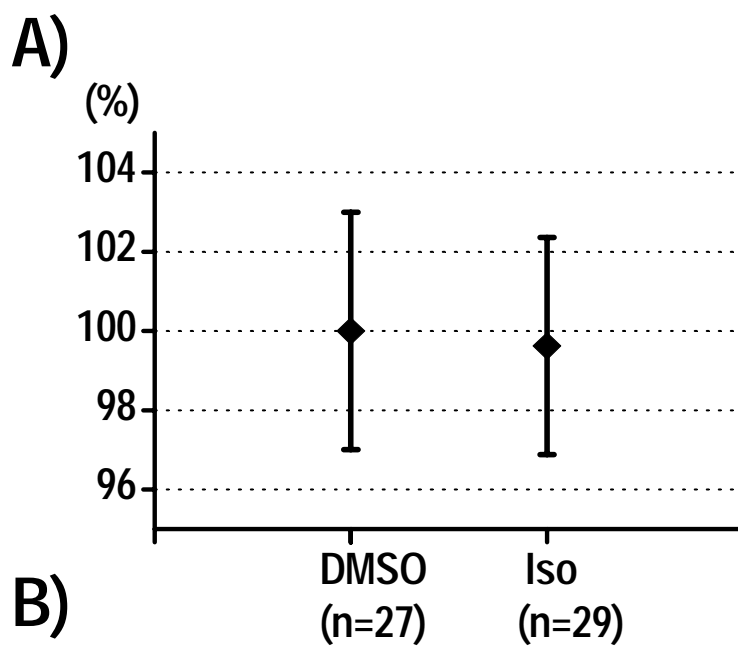
Fig. 3. SH-SY5Y cells were treated for 48h with DMSO (0,4%) or Iso (200 μ M) and the effects on cell proliferation was determined. A) Cell number in the cultures was measured by counting with a Z2 cytometer. B) Cell number in the cultures was also estimated by determining the total LDH content. The number of independent experiments (n value) is referred on the x axis. The y axis shows the proliferation rate and the DMSO-treated cells set the 100% value. Bar values display the 95% confidential interval (CI) of the experimental means. No significant statistical differences were found between DMSO and Iso treatments either in A) $p=0,855$ or B) $p=0,848$. The p value was calculated by the Student's t-test.

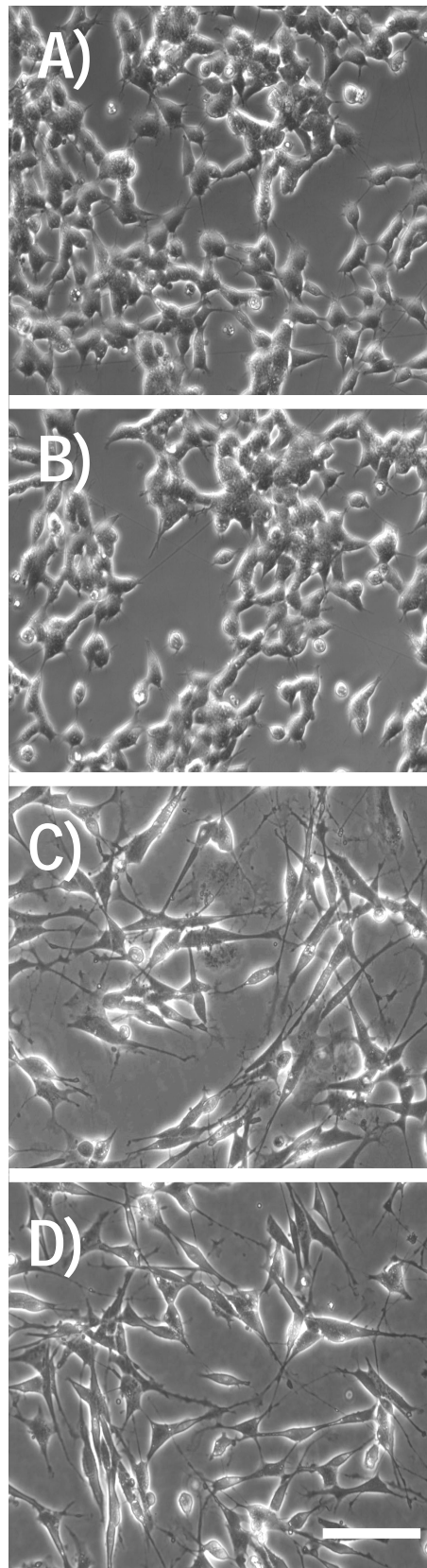
Fig. 4. Effects of Iso (200 μ M) on SH-SY5Y cell differentiation. A) Control SH-SY5Y cells after 24h in culture (untreated). B) SH-SY5Y cells treated with Iso for 24h. C) SH-SY5Y cells differentiated with RA (10 μ M) and photographed at the day 5 of the process. D) SH-SY5Y cells differentiated during 5 days with RA (10 μ M) in the presence of Iso. Bar value is 100 μ m.

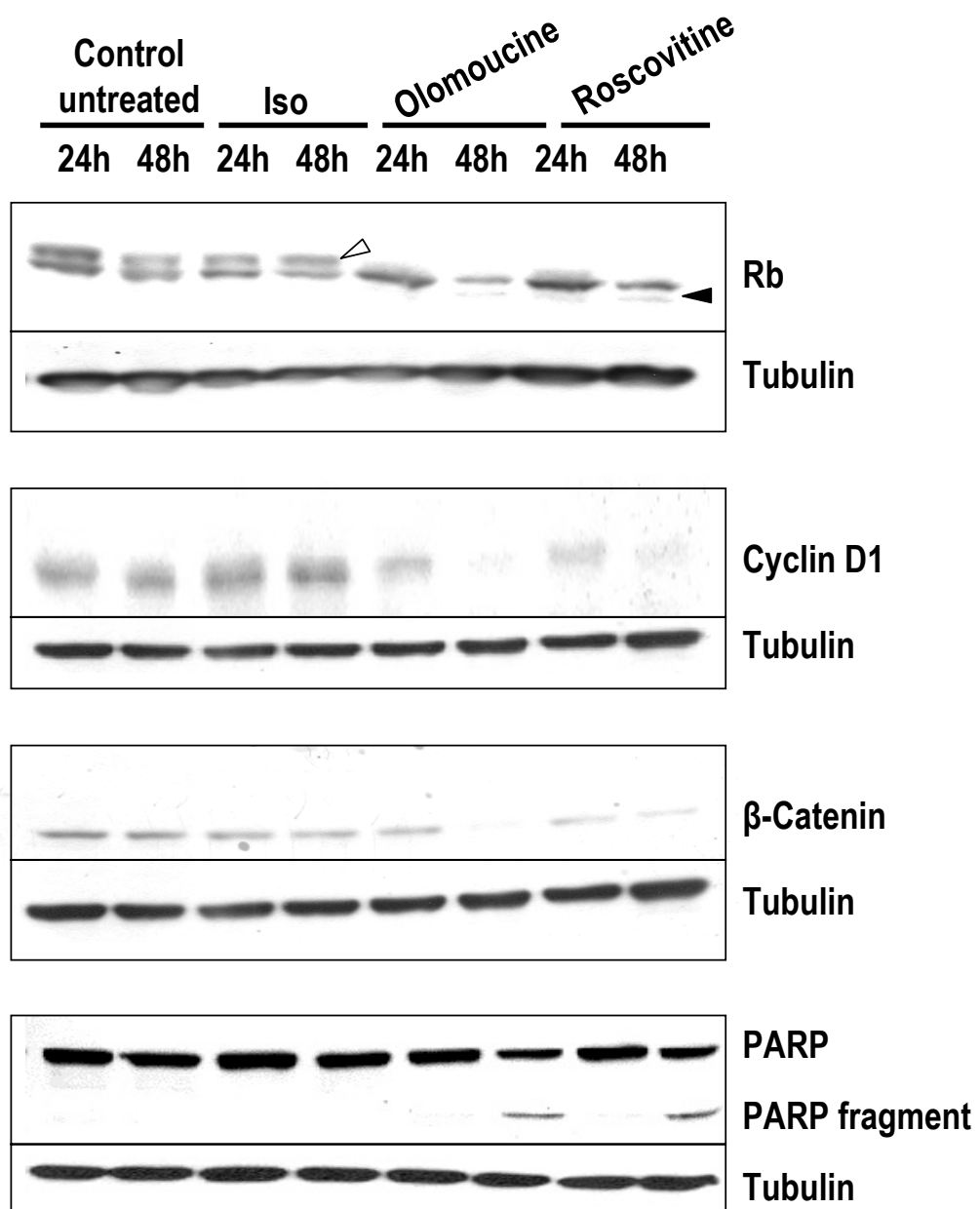
Fig. 5. SH-SY5Y cells were treated for 24h and 48h with Olomoucine (200 μ M), Iso (200 μ M) and Roscovitine (50 μ M), as stated in the figure. Protein extracts were obtained and analyzed by Western Blot. The phosphorylation state of Rb protein was studied. Bands containing the hyperphosphorylated forms of the protein were identified (open arrowhead). The caspase generated fragment was also detectable (full arrowhead). The cell content of Cyclin D1 and β -catenin was ascertained. Finally, PARP fragmentation indicating apoptosis and caspase activation was also determined. Tubulin was used to assess the amount of protein loaded by lane. The images shown are representative of several independent experiments.











8.4 L'OLOMOUCINA I LA ROSCOVITINA NO INDUEIXEN CANVIS EN ELS NIVELLS D'EXPRESSIONI DE FAS/FAS-L

Les SH-SY5Y són una línia cel·lular derivada d'un neuroblastoma humà que engega un programa apoptòtic després de 24 h de tractament amb olomoucina (200 μ M) o roscovitina (50 μ M) (Ribas i Boix, 2004). Una de les característiques d'aquesta línia cel·lular és l'expressió de diversos DR com Fas, DR5 i DcR1 (Eggert et al., 2001). El lligam de Fas és Fas-L, una citoquina expressada abundantment per les cèl·lules del sistema immune. Quan Fas-L s'expressa, és dirigida a la membrana plasmàtica i un cop allí pot ser proteolitzada per les metaloproteïnases associades a la membrana. Aquest tall originaria una forma soluble de Fas-L. S'ha vist que tant la forma soluble com la que està unida a la membrana són capaces d'induir l'activació de Fas (Becher et al., 1998). En el nostre model, vam detectar l'expressió d'uns nivells basals elevats de Fas-L, en comparació als de les cèl·lules Jurkat o les HL-60, utilitzades com a control positiu. La unió de Fas a Fas-L desencadena la via extrínseca d'apoptosi. Les SH-SY5Y mostraven nivells elevats de Fas i Fas-L. Aquest fet ens va fer plantejar quin mecanisme era utilitzat per les SH-SY5Y per evitar l'apoptosi, especialment en les condicions de creixement en el que es realitzava l'experiment, és a dir, a alta confluència. Semblava que la senyalització via Fas havia d'estar interrompuda en algun punt per sota del receptor. La recerca bibliogràfica ens va informar del fet que els gens de la CASP8 i la 10 són silenciats per metilació en moltes línies de neuroblastoma, donant-nos una explicació satisfactòria al fenomen observat. Malgrat tot, ja havíem explorat si els nivells de qualsevol de les dues proteïnes augmentaven durant el temps previ a l'activació de les caspases efectores. Les cèl·lules van ser tractades amb olomoucina i iso-olomoucina (l'isòmer inactiu de l'olomoucina) a una única dosi de 200 μ M. Posteriorment es realitzaren extractes i es determinà en paral·lel el contingut de Fas i Fas-L. No es van observar canvis en els nivells proteics d'aquestes proteïnes (veieu la figura 8.5). En conclusió, cap dels dos fàrmacs alterava l'expressió de les proteïnes Fas/Fas-L en el nostre paradigma experimental.

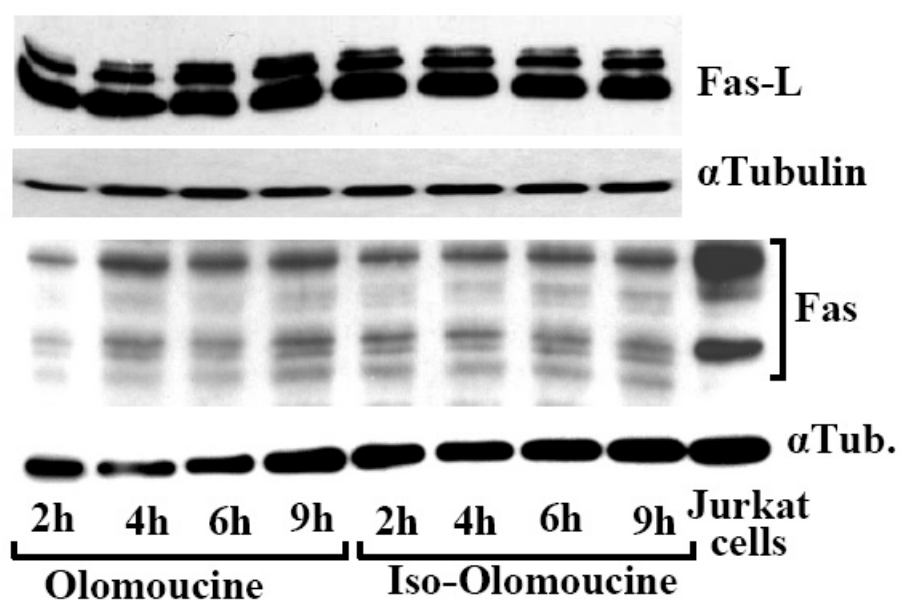


Figura 8.5. Els nivells de proteïna del sistema Fas si Fas-L no varien durant el tractament de les SH-SY5Y amb olomoucina. Les cèl·lules SH-SY5Y han estat tractades amb olomoucina o iso-olomoucina a la dosi de 200 μ M. Després d'una incubació tal com la que s'indica en la figura, s'han realitzat els extractes proteics i s'han analitzat per Western Blot amb els anticossos primaris contra Fas i Fas-L (Catalog # sc-715-G i Catalog # sc-956 respectivament, de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). La Tubulina és emprada com a control de la càrrega de cada pista. Extractes provinents de cèl·lules Jurkat han estat utilitzades com a control positiu.

8.5 L'OLOMOUCINA I LA ROSCOVITINA INDUEIXEN APOPTOSI A LES HL-60

Les HL-60 són una línia cel·lular derivada d'un pacient amb leucèmia promielocítica aguda. Poden ser diferenciades en cultiu cap a granulòcits, monòcits, macròfags i eosinòfils a través de protocols amb diversos agents, entre els quals trobem els èsters de forbol, la vitamina D o el butirat de sodi (Collins, 1987). L'elecció de les HL-60 en els nostres treballs va venir determinada precisament per aquesta capacitat de diferenciació i, alternativament, perquè no expressen la proteïna p53. Malauradament, no vam obtenir percentatges reproduïbles i significatius de diferenciació amb cap dels protocols utilitzats. Els resultats obtinguts en aquesta línia cel·lular es resumeixen a les figures 8.6 i 8.7

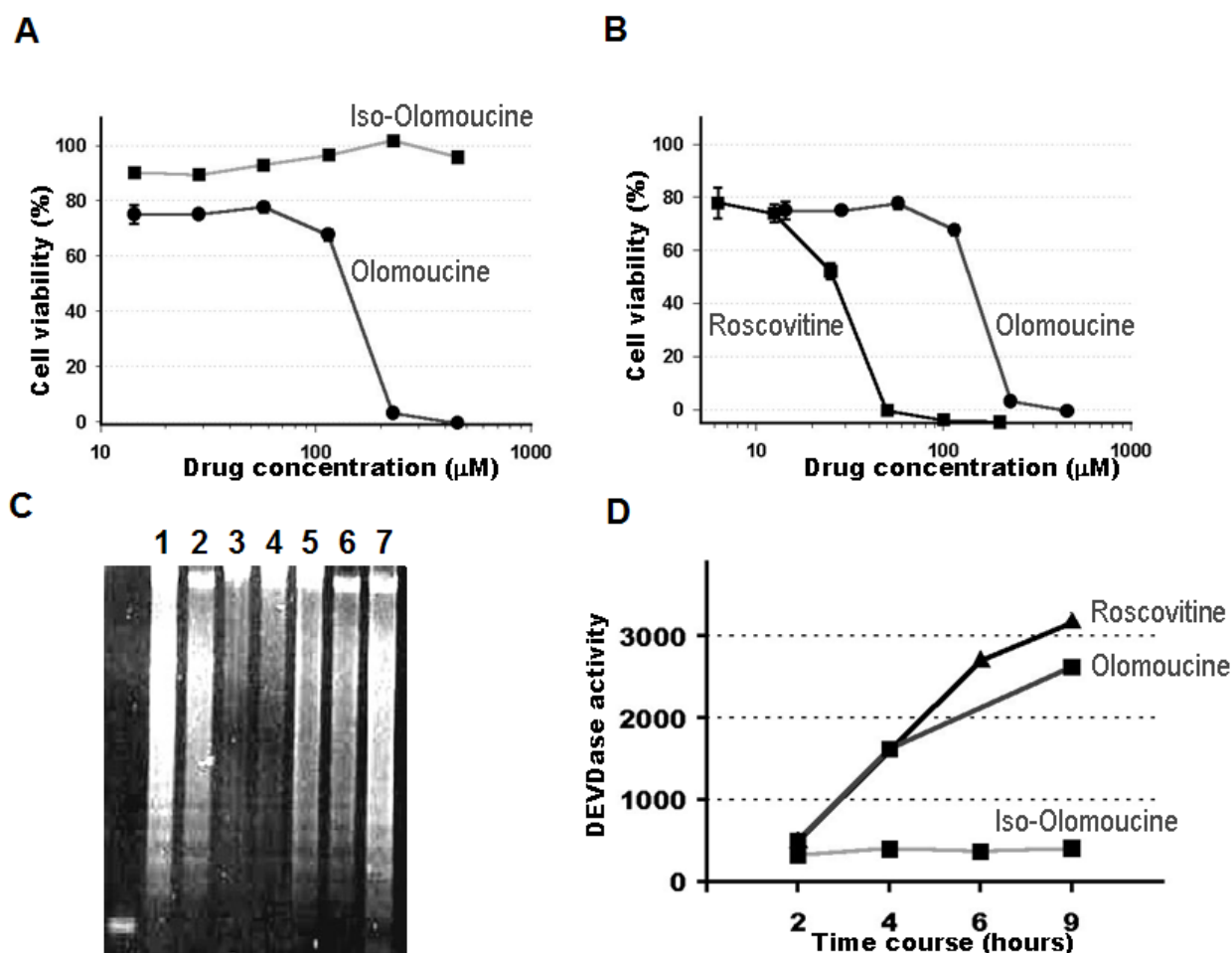


Figura 8.6. L'olomoucina i la roscovitina indueixen mort apoptòtica de forma dosi dependent a les HL-60. (A) Les HL-60 han estat tractades durant 24 hores amb olomoucina (●) i el seu isòmer inactiu, l'isoolomoucina (□) a les dosis indicades a l'eix de les abscisses. (B) Les HL-60 han estat tractades durant 24 hores amb olomoucina (●) i roscovitina (□) a les dosis indicades a l'eix de les abscisses. La viabilitat cel·lular a (A) i (B) ha estat determinada per l'assaig de reducció del MTS. El percentatge de supervivència es va obtenir referint els valors obtinguts als del control proliferant. Cada punt és la mitjana \pm SEM (*standard error of media*) d'almenys 3 experiments independents amb 6 mesures independents per experiment. (C) L'ADN va ser extret de les cèl·lules tractades durant 24 hores amb roscovitina 25 μ M (1) i 50 μ M (2), isoolomoucina 100 μ M (3) i 200 μ M (4), olomoucina 100 μ M (5) i 200 μ M (6) i estaurosporina 1 μ M (7). Aquest ADN es va fer migrar en un gel d'agarosa al 1,5 %. (D) Cinètica temporal d'activació de les caspases efectores (mesurada a través de l'activitat DEVDase i expressada en unitats arbitràries de fluorescència). Les HL-60 van ser tractades amb olomoucina (□ amb línia fosca), isoolomoucina (□ amb línia clara) i roscovitina (▲) durant els períodes indicats a l'eix de les abscisses. Es va mesurar la fluorescència alliberada pel tall del substrats AcDEVDafc. Cada punt és la mitjana \pm SEM (*standard error of media*) d'almenys 2 experiments independents amb 6 mesures independents per experiment.

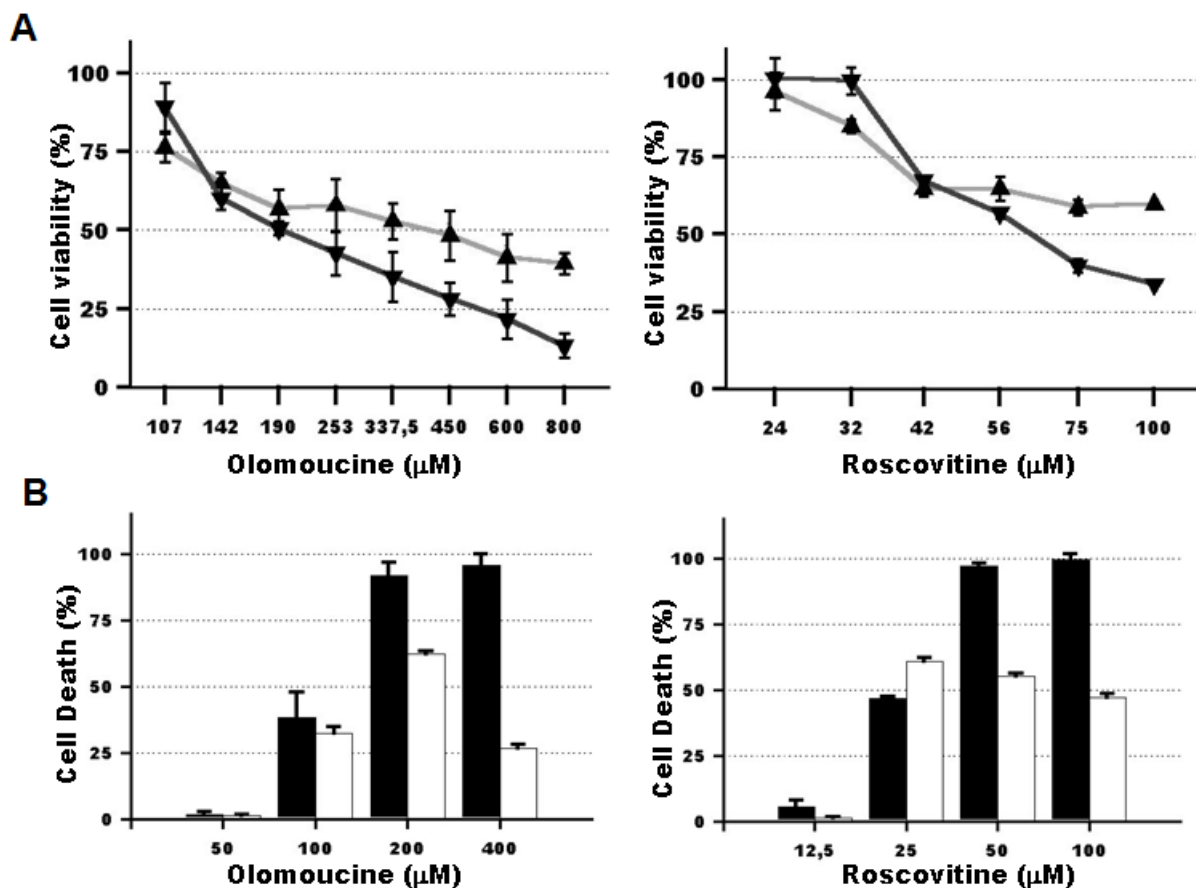


Figura 8.7. Efectes del z-VAD-fmk sobre la mort de l'olomoucina i la roscovitina a les HL-60. (A) Gràfica a l'esquerra. Les HL-60 han estat tractades durant 24 hores a les dosis indicades d'olomoucina (▼) i olomoucina més z-VAD-fmk a una única dosi de 50 µM (▲). Gràfica a la dreta. Les HL-60 han estat tractades durant 24 hores a les dosis indicades de roscovitina (▼) i roscovitina més z-VAD-fmk a una única dosi de 50 µM (▲). La viabilitat cel·lular ha estat determinada per l'assaig de reducció del MTS. El percentatge de supervivència es va obtenir referint els valors obtinguts als del control proliferant més o menys z-VAD-fmk. (B) Gràfica a l'esquerra. Les HL-60 han estat tractades durant 48 hores a les dosis indicades d'olomoucina (barra negra) i olomoucina més z-VAD-fmk a una única dosi de 50 µM (barra blanca). Gràfica a la dreta. Les HL-60 han estat tractades durant 48 hores a les dosis indicades de roscovitina (barra negra) i roscovitina més z-VAD-fmk a una única dosi de 50 µM (barra blanca). La mort cel·lular ha estat determinada per l'assaig d'alliberament de LDH (*lactate dehydrogenase*). Cada punt de (A) i (B) és la mitjana ± SEM (*standard error of media*) d'almenys 3 experiments independents amb 6 mesures independents per experiment.

ANALYSIS OF THE SYNERGISM BETWEEN R-ROSCOVITINE AND OTHER ANTINEOPLASIC DRUGS.

The experiments performed concerning this chapter, allow us to conclude:

1. No synergism is observed between R-roscovitine and DTX in SH-SY5Y cells.
2. Sublethal concentrations of R-roscovitine increase the ratio of apoptosis in SH-SY5Y challenged with nutlin-3, a p53-function activating drug.
3. The p21 and HDM2 protein content in SH-SY5Y cells subjected to nutlin-3, are increased by the presence of sublethal concentrations of R-roscovitine.

9.1 ARTICLE 4

R-ROSCOVITINE SENSITIZES SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS TO NUTLIN-3 TRIGGERED APOPTOSIS**Judit Ribas^{1,2}, Jacint Boix² and Laurent Meijer^{# 1}**¹CNRS, Cell Cycle Group, Station Biologique, B.P. 74, 29682 Roscoff cedex, Bretagne, FRANCE, and²Univ. of Lleida, School of Medicine, Mol. Pharmacology. Group, C/ Montserrat Roig 2, 25008 Lleida, Catalunya, SPAIN.**Abstract**

In this study we have characterized the combined effects of R-Roscovitin, a CDK inhibitory drug, and Nutlin-3, a p53 activating drug, on a neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. Both compounds showed to synergize since combined at sublethal concentrations were able to cause significant ratios of apoptosis in cultured cells. Bcl-XL protein overfunction protected these cells from apoptosis induced by either Nutlin-3 alone or the R-Roscovitin plus Nutlin-3 association, however failed to prevent apoptosis triggered by lethal concentrations of R-Roscovitin. Western blot studies showed R-Roscovitin was increasing Nutlin-3-mediated p53 stability, further substantiating that R-Roscovitin was merely sensitizing SH-SY5Y cells to Nutlin-3 actions.

Keywords: R-Roscovitin, Nutlin-3, apoptosis, p53, Bcl-X_L, CDK

To whom correspondence should be addressed:

Laurent Meijer

CNRS, Cell Cycle Group, Station Biologique, B.P. 74

29682 Roscoff cedex, Bretagne, FRANCE

Phone: +33.(0)2.98.29.23.39 FAX: +33.(0)2.98.29.23.42 e-mail: meijer@sb-roscoff.fr

1. Introduction

Nutlin-3 is a cis-imidazoline compound that has recently been described as a potent and selective antagonist of MDM2 binding to p53 protein. Nutlin-3 is a small molecule and, as a consequence, a promising new drug able to unleash the p53 tumor suppressing power in a cell [1]. MDM2, renamed HDM2 in humans, is coded by a gene under the positive transcriptional control of p53 [2]. On the contrary, HDM2 is a negative regulator of p53 function by its involvement in exporting p53 from the nucleus and the promotion of the ubiquitin-proteasome mediated p53 degradation [3]. Therefore, a negative feed-back is established between both proteins, a regulatory loop targeted by Nutlin-3.

CDK inhibitory drugs are also being studied as promising agents for cancer therapy. For instance R-Roscovitrine, an enantiomer of Roscovitine, has reached phase II clinical trials [4]. Roscovitine has proven to be an effective inductor of apoptosis in human cells derived from breast cancers [5], chronic lymphocytic leukemia [6] or neuroblastoma [7].

Roscovitrine has shown to enhance radiation therapy of breast cancer [8]. In such a combinatorial approach, Roscovitine and farnesyltransferase inhibitors have synergized to trigger apoptosis in several cancer cell lines [9]. Finally, the effect of R-Roscovitrine combined with standard chemotherapy is presently under clinical investigation [10]. All these antecedents prompted us to explore if Nutlin-3 and R-Roscovitrine displayed a pharmacological synergism on apoptosis induction in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y is a cell line derived from an abdominal metastasis of a human neuroblastoma in which we have already characterized the apoptotic process induced by Roscovitine [7]. Interestingly, in SH-SY5Y cells, p53 protein is present and capable to engage the canonical p53-mediated transcriptional responses and apoptosis [11]. In the present study, R-Roscovitrine was used instead of Roscovitine because of its clinical ongoing investigations. We found R-Roscovitrine and Nutlin-3 synergized at inducing apoptosis. In addition, Roscovitine- and R-Roscovitrine-induced apoptosis was characterized by being refractory to Bcl-X_L protective effects. On the contrary, Bcl-X_L overexpression showed to prevent apoptosis in SH-SY5Y cells challenged with Nutlin-3 or Nutlin-3 plus R-Roscovitrine to a similar extent. Therefore, when Nutlin-3 and R-Roscovitrine were combined, the apoptotic pathway triggered by Nutlin-3 was the one taking place. This allowed us to conclude that sublethal concentrations of R-Roscovitrine made SH-SY5Y cells more susceptible to Nutlin-3 apoptotic actions.

2. Material and Methods

2.1. Chemical reagents

R-Roscovitrine was provided by N. Gray, Novartis Reserch Foundation (San Diego, CA, USA). Nutlin-3 was purchased from Cayman (Ann Arbor, MI, USA). AcDEVDaFc (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-

[trifluoromethyl] coumarin) was obtained from MP biomedical (Strasbourg, France). CellTiter 96®kit, containing the MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxy methoxyphenyl]-2-[4-sulphophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) reagent, and Cytotox 96®kit, containing the reagents and standards to determine lactate dehydrogenase activity (LDH), were provided by Promega (Madison, WI, USA). Unless otherwise stated, non-listed reagents were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cell lines and cell culture

SH-SY5Y cell line was grown in DMEM medium from Cambrex (Emerainville, France) supplemented with 2mM L-glutamine from Eurobio (Courtaboeuf, France) and a 10% volume of fetal calf serum from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cell cultures were maintained in a 95% air, 5% CO₂, water saturated atmosphere at 37°C. Culture dishes and other plastic disposable tools were supplied by Corning (Corning, NY, USA). SH-SY5Y cell clones transfected with the pcDNA3/Bcl-X_L and the pcDNA3 empty vector were obtained and cultivated as reported previously [7, 12]. R-Roscovitin and Nutlin-3 stock solutions were prepared in DMSO at a 20 mM concentration. From these stock solutions, drugs were adjusted in the culture media at the final concentrations reported in the text and figure legends. DMSO concentration never surpassed 1% in the culture media, a non toxic concentration in SH-SY5Y cell line.

2.3. Determinations of cell death, cell viability and effector caspase activity in cell cultures.

The MTS method allows to measure cell viability and the LDH one, cell death, in multiwell plate cultures. Both procedures are basically performed according to provider instructions and have been described in more detail before [7]. Trypan blue is a classical method to assess cell viability. Healthy cells exclude Trypan blue and viability is determined by light microscope counting. Counts were performed on cultures grown in 24 multiwell plates containing 2-3 x 10⁵ cells/well. After 48 h of seeding, cells were treated for 48 hours, then collected and gently dissociated in the culture medium. One volume of a 0.4% Trypan blue solution was added to 4 volumes of the cell suspension and counted with the aid of the haemocytometer. Apoptotic nuclear morphology was assessed by means of the bisBenzimide (Hoechst 33342) dye and fluorescence microscopy [7, 12]. Effector caspase activation (DEVDase activity) was quantified by measuring the proteolysis of AcDEVDafc, a fluorogenic substrate. Determinations of DEVDase activity on 96 multiwell plates were performed as we had standardized before [7, 12].

2.4. Protein extraction and Western blotting

Cells extracts for Western blotting analysis were performed as follows. Cells were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) and lysed by sonication in a buffer containing 1% SDS, 50 mM Tris / HCl (pH 6.8), 1mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (10 g/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 100 µM Benzamidine). Following a room temperature centrifugation at 12000g for 15 minutes, the protein extract (supernatant) was obtained. Protein concentration was determined in these supernatants by

means of the DC Protein Assay from BioRad (Hercules, CA, USA) and equal amounts of protein were subjected to electrophoresis in 8-12% polyacrylamide gels. Then, proteins were transferred to 0.45 μm nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell) and membranes were reacted with the following primary antibodies: Anti-p53 (Catalog # sc-263) and anti-MDM2 (Catalog # sc-965) purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-p21 (Catalog # OP64) from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and anti-Tubulin (Catalog # T5168) from Sigma. Secondary peroxidase conjugated antibodies were also from Sigma. Concerning antibody dilutions we followed the provider suggestions. Immunoblots, were finally visualized by means of enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham).

3. Results

3.1. R-Roscovitrine and Nutlin-3 synergized to induce apoptosis in SH-SY5Y cells.

The first approach to evidence a putative synergism between R-Roscovitrine and Nutlin-3 in SH-SY5Y cells was to determine the range of concentrations causing cell death by each compound separately. We employed the MTS reduction assay to quantify cell viability. These determinations allowed us to define a lethal (37,5-50 μM) and a sublethal (10 μM) concentration for R-Roscovitrine, and a lethal (10 μM) and almost sublethal (2,5 μM) concentration for Nutlin-3, after 48 hours of cell treatment (Fig. 1A). Next we tested the joint addition of R-Roscovitrine (10 μM) and Nutlin-3 (2,5 μM) and we found a reduction in cell viability far greater than the one caused by each drug used alone at identical sublethal concentration (See also Fig. 1A). In conclusion, a pharmacological synergism had been defined. Determinations were also performed after a 24 hour treatment, however the near to null induction of cell death by R-Roscovitrine (10 μM), Nutlin-3 (2,5 μM) or their association impaired to evidence the synergism. This is in agreement with what has been reported about 48 hours being the optimal period to detect Nutlin-3 mediated apoptosis [1].

It is known MTS reduction can be caused by other cellular events different from cell death. In order to circumvent this problem, we are systematically validating the MTS results by comparing them with those provided by the LDH release method [7]. As shown in Fig. 1B, cell death quantification by the LDH procedure yielded consistent and complementary values to those referred before (Fig. 1A). The pharmacological synergism between R-Roscovitrine and Nutlin-3 was also observed in the LDH release determinations.

The MTS and LDH procedures are very appropriate to quantify cell viability and cell death in culture plates. However, they do not provide any information about the ongoing type of cell death. In order to assess the type of cell death induced by the combination of R-Roscovitrine (10 μM) and Nutlin-3 (2,5 μM), we followed two complementary approaches. First, a morphological one, bisBenzimide staining and fluorescence microscopy allowed the unequivocal identification of apoptotic nuclei (Fig. 2A).

Second, a biochemical one, the determination of effector caspase 3 and 7 activation (DEVDase activity) by means of the cleavage and quantification of their AcDEVDafc, fluorogenic substrate (Fig. 2B). An increase of DEVDase activity is a biochemical and early evidence of apoptosis being triggered in a cell population. After 12 hours of cell treatment a marked increase of DEVDase activity was found when cells were challenged with Roscovitine (10 μ M) plus Nutlin-3 (2,5 μ M). In the DEVDase experiments, cell death was controlled at 48 hours by the Trypan blue staining procedure, the ratios of cell death were $5,56 \pm 1,25$ % for R-Roscovitine (10 μ M), $9,67 \pm 1,58$ % for Nutlin-3, and $46,35 \pm 3,22$ % for the combined treatment. These values of cell death were consistent with those obtained with the LDH procedure (Fig. 1B), thus providing full biological significance to the DEVDase activity ones. In conclusion, both approaches not only defined apoptosis as the type of cell death taking place but supported the existence of a pharmacological synergism between R-Roscovitine and Nutlin-3.

3.2. R-Roscovitine acts by making SH-SY5Y cells more sensitive to Nutlin-3 proapoptotic effects.

Nutlin-3 is a p53 activator and p53-induced apoptosis is known to partially occur through mitochondrial outer membrane permeability [13, 14]. Bcl-X_L is a protein of the Bcl-2 family known to surpass Bcl-2 in its ability to neutralize mitochondrial-mediated apoptosis, for instance in the SH-SY5Y undergoing staurosporine-induced apoptosis [12]. Therefore, we wondered about the putative effect of Bcl-X_L overexpression on the apoptotic processes triggered by R-Roscovitine, Nutlin-3 and the combined treatment. SH-SY5Y cells overexpressing Bcl-X_L and empty vector transfected controls were used to address this issue. As a functional control, we tested if these cells continued to be resistant to staurosporine induced apoptosis (Fig. 3A). In addition, we had already demonstrated that neither Bcl-2 nor Bcl-X_L overfunction were able to protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by racemic Roscovitine [7]. However, we had not assayed R-Roscovitine before. Experiments were performed and we found R-Roscovitine was not behaving differently from its racemic counterpart (Fig. 3A).

Next we tested the effect of Bcl-X_L overfunction on Nutlin-3 induced apoptosis. We found Bcl-X_L overexpression was protecting SH-SY5Y cells after a 48 hours treatment with 10 μ M Nutlin-3, the lethal concentration used in this study (Fig. 3B). This was not an unexpected finding because it was consistent with the mitochondrial mechanisms of apoptosis engaged by the p53 protein. When 10 μ M R-roscovitine + 2.5 μ M Nutlin-3 were tested on the pcDNA3/Bcl-X_L transfected cells an increase of cell viability was also found. The combined treatment and 10 μ M Nutlin-3 alone caused similar ratios of cell death. Facing these apoptotic stimuli, the extent of cells rescued by Bcl-X_L overexpression was also remarkably similar (Fig. 3B). This result had seminal implications concerning the nature of the synergism between R-Roscovitine and Nutlin-3. The apoptotic pathway underlying the combined

treatment seemed to be identical to the pathway engaged by lethal concentrations of Nutlin-3 alone. Therefore, R-Roscovitin seemed to merely sensitize SH-SY5Y cells to Nutlin-3 actions.

To further support this conclusion, we explored how these drug treatments were impinging on p53 protein and its transcriptional function. We analyzed the cell content of p53 and two of its transcriptional targets, HDM2 and p21, by Western Blotting (Fig. 4). After 24 hours of treatment, R-roscovitine (10 μ M) was sufficient to induce the stabilization of p53 protein but not apoptosis. In coherency with its mode of action, Nutlin-3 stabilized p53 and increased HDM2 and p21 protein content in a concentration-dependent manner. Interestingly, the association of 10 μ M R-Roscovitin + 2.5 μ M Nutlin-3 rivaled 10 μ M Nutlin-3 at these cellular effects, thus indicating again a synergism. Precisely, R-Roscovitin seemed to make SH-SY5Y cells more sensitive to Nutlin-3 mediated p53 stabilization and activation.

4. Discussion

In this report we have shown R-roscovitine synergized Nutlin-3 at inducing apoptosis in a cell line derived from a human neuroblastoma, SH-SY5Y. Bcl-XL overexpression and protein analysis of p53 stability and transcriptional function allowed us to realize R-Roscovitin was merely increasing the susceptibility of cells to both, Nutlin-3-induced apoptosis and Nutlin-3-mediated activation of p53. Concerning Nutlin-3, all our results were consistent with its reported mode of action, the inhibition of the interaction between p53 and HDM-2. Apoptosis in response to p53 is known to occur by multiple simultaneous mechanisms, mitochondrial and non-mitochondrial, transcriptional and non-transcriptional [13, 14]. Bcl-X_L protein is characterized by its ability to block mitochondrial mediated apoptosis and, therefore, its overexpression in SH-SY5Y afforded a partial protection from Nutlin-3/p53 mediated apoptosis.

Our results suggest the synergism to induce apoptosis between Nutlin-3 and R-Roscovitin is surely relying on the R-Roscovitin ability to potentiate Nutlin-3 actions, but what is the molecular mechanism involved? R-Roscovitin is a CDK-inhibitory drug that has demonstrated to be very selective for CDK in biochemical tests [15, 16]. Therefore, the question is how the inhibition of a given CDK could contribute to the stability of the p53 protein. The activation of p53 has been reported in cells challenged with racemic Roscovitin due to a decrease in HDM-2 protein [17]. However, we have observed HDM-2 to increase and not to decrease in SH-SY5Y cells facing sublethal concentrations of R-Roscovitin (Fig. 4). The pharmacological inhibition of CDK9 has proven to promote the nuclear accumulation of p53 without diminishing MDM-2 transcription [18]. Furthermore, the inhibition of CDK2 has been reported to activate an intra-S-phase checkpoint that leads to an ATM/ATR-dependent phosphorylation and activation of p53 protein [19]. Interestingly, CDK9 and CDK2 are included in the inhibitory profile of R-Roscovitin.

We have reported the apoptotic process triggered by racemic Roscovitine to be refractory to an excess of function of either Bcl- X_L or Bcl-2 proteins [7]. In this report we have demonstrated the same conclusion holds true for Bcl- X_L and R-Roscovitine at lethal concentrations. In addition we have found Bcl- X_L preventing Nutlin-3 triggered, p-53 mediated, apoptosis. Taken together all these facts, we put into question a determinant role for p53 in the apoptotic processes triggered by racemic Roscovitine or R-Roscovitine alone. In other words, the mitochondrial mechanisms activated by p53 to cause apoptosis seem not to be engaged by CDK inhibitory drugs like R-Roscovitine, Roscovitine or Olomoucine when triggering apoptosis. A deficit in p53 function is found in more than 50% of all human cancers. However in many cancer types, a functional p53 system is found. This is the case of human neuroblastoma tumors and cell lines, like SH-SY5Y [11]. Therefore, Nutlin-3 is a promising drug envisaging the treatment of this childhood malignancy. The synergism we have reported suggests a low dose of R-Roscovitine would surely allow to reduce the dose of Nutlin-3 (or related compounds) without reducing its cytotoxic efficacy against neuroblastoma or other tumors. Finally, Bcl-2 or Bcl- X_L overexpression and the subsequent resistance to apoptosis are associated with a reduced response to chemotherapy. The fact that Bcl-2 and Bcl- X^L fail to block the apoptotic processes triggered by the appropriate doses of R-Roscovitine, suggests that resistances could be managed in the scenario of a combined therapy by simply raising the R-Roscovitine dosage.

References

- [1] L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E.A. Liu, In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303 (2004) 844-848.
- [2] J.D. Oliner, K.W. Kinzler, P.S. Meltzer, D.L. George, B. Vogelstein, Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 358 (1992) 80-83.
- [3] X. Wu, J.H. Bayle, D. Olson, A.J. Levine, The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7 (1993) 1126-1132.
- [4] A.M. Senderowicz, Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 670-678.
- [5] O.P. Mgbonyebi, J. Russo, I.H. Russo, Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 59 (1999) 1903-1910.
- [6] I.N. Hahntow, F. Schneller, M. Oelsner, K. Weick, I. Ringshausen, F. Fend, C. Peschel, T. Decker, Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18 (2004) 747-755.
- [7] J. Ribas, J. Boix, Cell differentiation, caspase inhibition and macromolecular synthesis blockage, but not Bcl-2 or Bcl-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs. *Exp. Cell Res.* 295 (2004) 9-24.
- [8] L. Maggiorrella, E. Deutsch, V. Frascogna, N. Chavaudra, L. Jeanson, F. Milliat, F. Eschwege, J. Bourhis, Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 63 (2003) 2513-2517.
- [9] H. Edamatsu, C.L. Gau, T. Nemoto, L. Guo L, F. Tamanoi, Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene.* 19 (2000) 3059-3068.
- [10] A.M. Senderowicz, Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther.* 2 (2003) S84-S95.
- [11] H. Cui, A. Schroering, H.F. Ding HF, p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 1 (2002) 679-686.
- [12] V.J. Yuste, I. Sanchez-Lopez, C. Sole, M. Encinas, J.R. Bayascas, J. Boix, J.X. Comella, The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 80 (2002) 126-139.
- [13] S. Erster, U.M. Moll, Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 843-850.

- [14] J. Yu, L. Zhang, The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 851-858.
- [15] M.A. Fabian, W.H. 3rd. Biggs, D.K. Treiber, C.E. Atteridge, M.D. Azimioara, M.G. Benedetti, T.A. Carter, P. Ciceri, P.T. Edeen, M. Floyd, J.M. Ford, M. Galvin, J.L. Gerlach, R.M. Grotzfeld, S. Herrgard, D.E. Insko, M.A. Insko, A.G. Lai, J.M. Lelias, S.A. Mehta, Z.V. Milanov, A.M. Velasco, L.M. Wodicka, H.K. Patel, P.P. Zarrinkar, D.J. Lockhart DJ, A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 23 (2005) 329-336.
- [16] S. Bach, M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S.P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D.C. Liang, H. Galons, J.F. Dierick, L.A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schachtele, A.S. Lerman, A. Carnero, Y. Wan, N. Gray, L. Meijer, Roscovitine targets: Protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem.* 280 (2005) 31208-31219.
- [17] W. Lu, L. Chen, Y. Peng, J. Chen, Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene.* 20 (2001) 3206-3216.
- [18] H.M. O'Hagan, M. Ljungman, Nuclear accumulation of p53 following inhibition of transcription is not due to diminished levels of MDM2. *Oncogene.* 23 (2004) 5505-5512.
- [19] Y. Zhu, C. Alvarez, R. Doll, H. Kurata, X.M. Schebye, D. Parry, E. Lees, Intra-S-phase checkpoint activation by direct CDK2 inhibition. *Mol Cell Biol.* 24 (2004) 6268-6277.

Figure Legends

Fig. 1. R-roscovitine (R) and Nutlin-3 (N) display a pharmacological synergism at inducing cell-death. SH-SY5Y cells were treated during 48 hours with R-roscovitine at a sublethal (10 μ M, black bar) and lethal (50 μ M, white bar) concentrations. Cells were also treated for 48 hours with Nutlin-3 at sublethal (2,5 μ M, black bar) and lethal (10 μ M, white bar) concentrations. In parallel, cells were also challenged with 10 μ M R-roscovitine plus 2,5 μ M Nutlin-3 (R+N). A) Determinations of cell viability were performed by the MTS procedure. The bar value is the mean \pm SEM of three independent experiments with six independent measurements per experiment B) Determinations of cell death were performed by the LDH procedure. The bar value is the mean \pm SEM of three independent experiments with three independent samples per experiment.

Fig. 2. The death process triggered by the combination of R-roscovitine and Nutlin-3 is apoptotic. A) SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M R-roscovitine (R), 2,5 μ M Nutlin-3 (N), both (R+N) or left untreated (U) for 24 hours. Then bisBenzimide staining was performed and apoptotic nuclei observed by fluorescence microscopy. Apoptotic nuclei can be easily identified by their brightness and fragmentation in the R+N sample. Scale bar = 50 μ m. B) Effector caspase activation (DEVDase activity expressed in arbitrary fluorescent units) was determined after 12 hours of treatment with 10 μ M R-roscovitine (R), 2,5 μ M Nutlin-3 (N) and their association (R+N) The bar value is the mean \pm SEM of two independent experiments with three independent measurements per experiment.

Fig. 3. Effects caused by Bcl- X_L overexpression on SH-SY5Y cells treated with R-Roscovitine (R), racemic Roscovitine (rR), Staurosporine (Sts), Nutlin-3 (N) and the R + N association at the concentrations stated in the figure. Cell viability was determined by the MTS procedure at 24 hours of treatment (A) and 48 hours of treatment (B). SH-SY5Y cells transfected with the pcDNA3/Bcl- X_L construct (white bars) and the pcDNA3/empty vector (black bars). The bar value is the mean \pm SEM of at least three independent experiments with at least three independent determinations per experiment.

Fig. 4. Effects of R-Roscovitine on Nutlin-3 induced p53 stabilization and transcriptional activation. SH-SY5Y cells were treated for 24 hours with 10 μ M R-roscovitine (R), 2,5 μ M and 10 μ M Nutlin-3 (N), 10 μ M R-roscovitine + 2,5 μ M Nutlin-3 (R+N) or left untreated (U). Extracts were obtained and analyzed by Western blot with the antibodies indicated in the figure. Tubulin was used to ascertain the amount of protein loaded by lane.

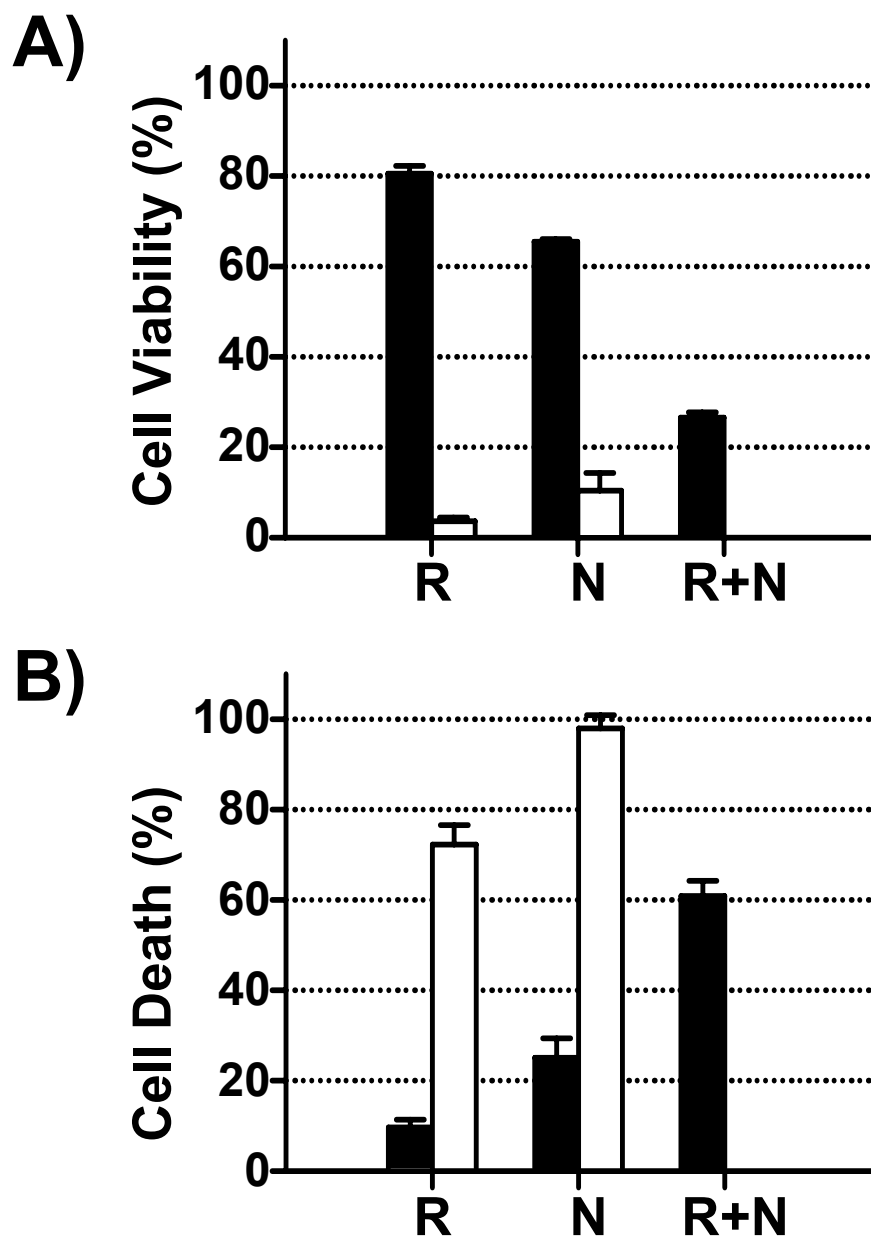


Fig. 1

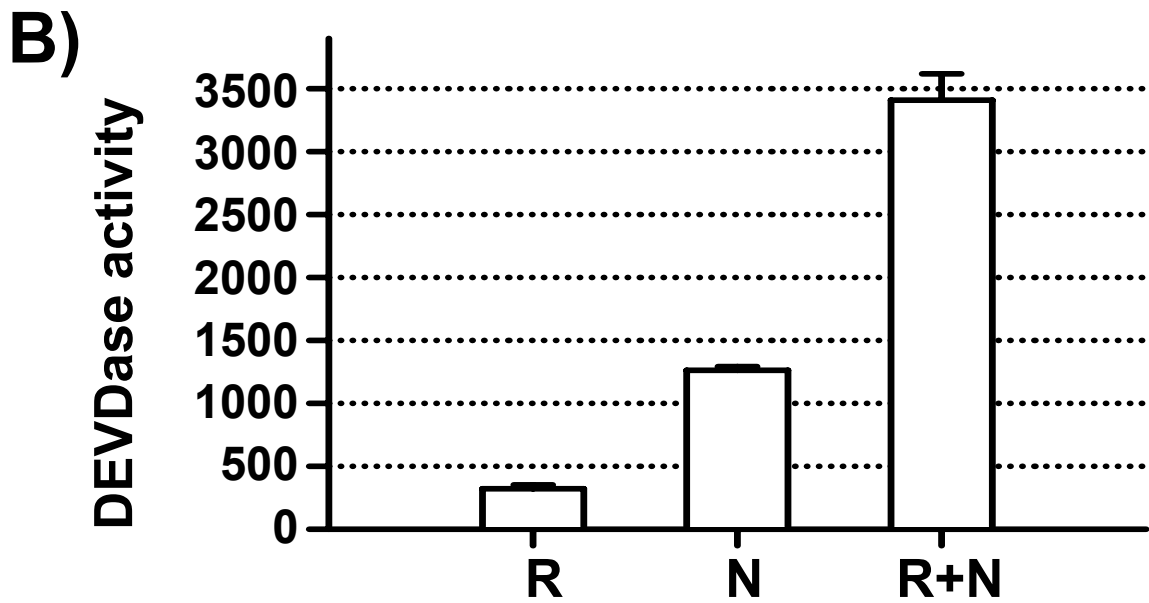
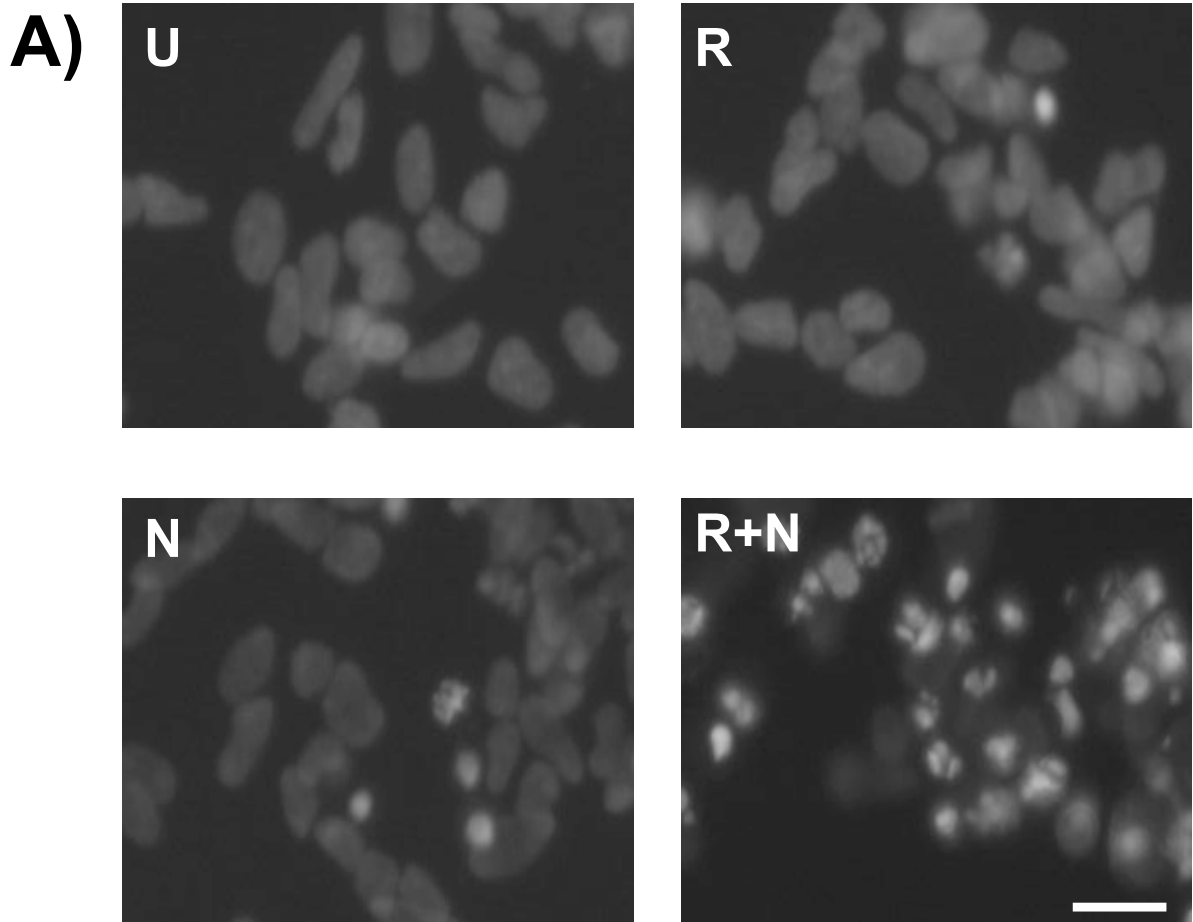


Fig. 2

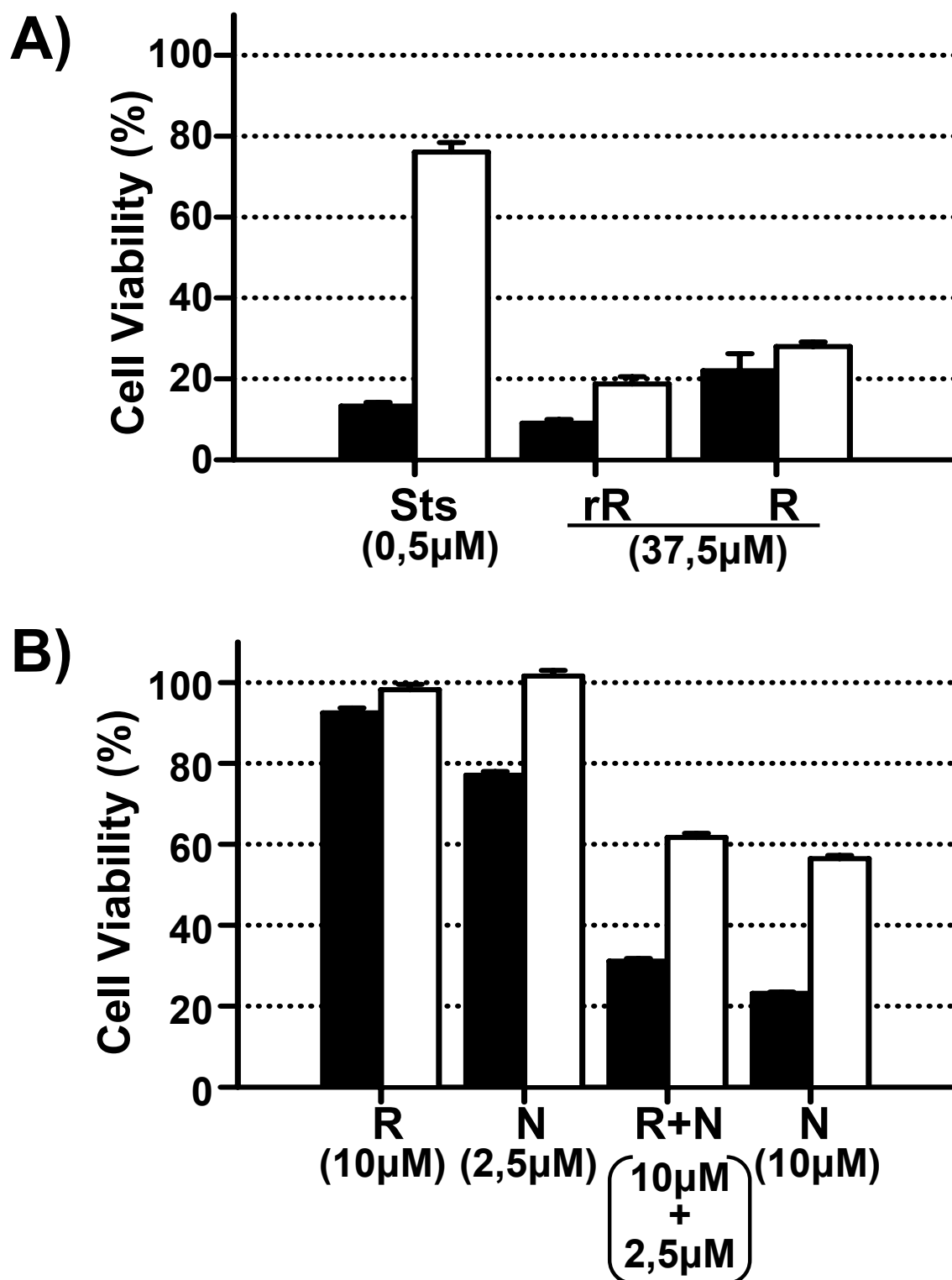


Fig. 3

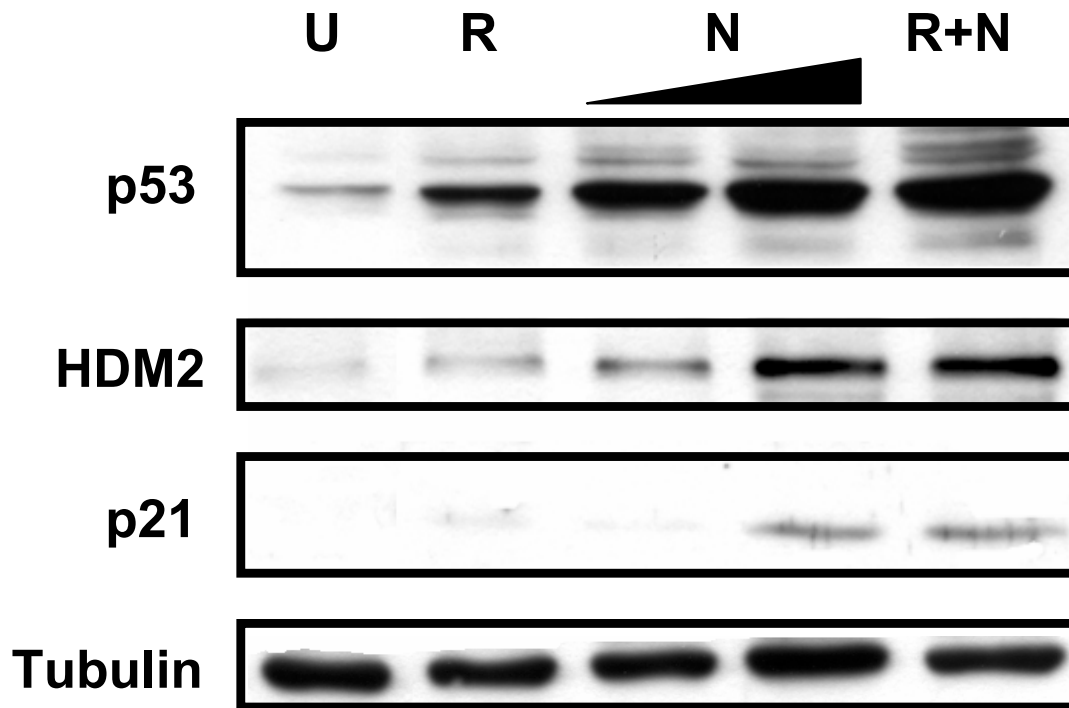


Fig. 4

9.2 THERAPIES SEQUENTIELLES PAR LES TOXIQUES DES MICROTUBULES ET LES INHIBITEURS DES CDKs.

La thérapie séquentielle a été appliquée en vue d'améliorer l'efficacité thérapeutique des toxiques des microtubules (TM). Cette technique consiste en la réalisation d'une séquence précise de traitements dans le temps. Parmi les quelques TMs¹ qui agissent par le site d'union des taxanes aux microtubules, nous trouvons le docétaxel (DTX), le paclitaxel (PTX), l'épothilone B (Epo B) et le Xanthochymol/Guttiférone (X/G). Les taxanes, par exemple, promeuvent l'agrégation des microtubules et bloquent les cellules en métaphase (Schiff et al., 1979). L'augmentation de l'activité CDK1/cycline B pendant l'arrêt mitotique des taxanes est nécessaire pour le processus de mort (Shen et al., 1998). De plus, plusieurs composés anti-tumoraux, parmi lesquels se trouve le PTX, induisent l'augmentation de la survivine (Wall et al., 2003). La survivine a été impliquée dans la cytoprotection et la sauvegarde de l'intégrité des microtubules (Altieri, 2001). La survivine phosphorylée sur la Thr³⁴ (par le complexe CDK1/cycline B) est plus stable et joue un rôle antiapoptotique (Zangemeister-Wittke and Simon, 2004). L'augmentation de la survivine pendant le traitement avec plusieurs composés anti-tumoraux, accompagnée de l'augmentation l'activité de CDK1/ cycline B par les taxanes, aboutiraient à une diminution de la toxicité de ces composés. Motwani et al. (1999 et 2003) montrent que la séquence de traitement DTX ou PTX suivi du flavopiridol aboutit à une augmentation de la toxicité. La séquence inverse est inactive quant à l'augmentation de la toxicité, et plus encore le pré-traitement avec le flavopiridol préalablement au DTX, montre des effets antagoniques par rapport au traitement avec DTX tout seul. Sur base des ces observations, nous avons émis l'hypothèse d'un effet bénéfique d'un traitement séquentiel des cellules par les TMs suivis des inhibiteurs de CDKs.

Objectifs:

1. Comparaison de la toxicité induite par plusieurs TMs.
2. Caractérisation de la toxicité induite par la R-roscovitine et le flavopiridol.
3. Étude de la synergie résultant du traitement séquentiel DTX suivi du flavopiridol.
4. Étude de la synergie résultant du traitement séquentiel DTX suivi de la R-roscovitine.

9.2.1 MATERIEL ET METHODES

Conditions spécifiques de culture et traitement.

¹TM est une abréviation pour toxique des microtubules.

Pour l'expérience de la thérapie séquentielle entre le DTX et le flavopiridol, les cellules SH-SY5Y ont été cultivées pendant 48 h dans les conditions standards décrites précédemment (Ribas and Boix, 2004).

Différents traitements ont été effectués :

- a. milieu sans drogue (MSD).
- b. 200 nM flavopiridol seul pendant 24 h.
- c. 200 nM flavopiridol seul pendant 24 h, le milieu est ôté et les cellules sont placées en présence du milieu sans drogue.
- d. 5 nM DTX seul pendant 24 h.
- e. 5 nM DTX seul pendant 24 h, le milieu est ôté et les cellules sont placées en présence du milieu sans drogue.
- f. 200 nM flavopiridol pendant 24 h suivi du retrait du milieu précité et de l'ajout du milieu contenant le DTX 5 nM pendant une période de 24 h.
- g. 5 nM DTX pendant 24 h suivi du retrait du milieu précité et de l'ajout du milieu contenant flavopiridol 200 nM pendant une période de 24 h.

Pour l'expérience de la thérapie séquentielle entre le DTX et la R-roscovitine, les cellules neuroblastiques ont été cultivées comme décrit au paragraphe précédent et les cellules ont été soumises à différents traitements comme mentionnés sur les figures.

Détermination de la viabilité et de la mort cellulaire.

Le kit CellTiter 96® de MTS et le Cytotox 96® de LDH sont fournis par Promega (Madison, WI, USA). La détermination de la viabilité cellulaire par MTS et de la mort cellulaire par LDH a été réalisée comme décrit dans Ribas and Boix, 2004.

9.2.2 RESULTATS

1. Comparaison de la toxicité induite par plusieurs TMs.

Le traitement de la lignée des SH-SY5Y avec DTX, PTX, EpoB et X/G induit une diminution de la viabilité cellulaire dose dépendante (Fig 1. graphes à gauche). De manière surprenante, la diminution de la viabilité n'est évidente qu'à partir des 48h. Les SH-SY5Y sont l'une des lignées neuroblastiques les plus résistantes à la mort cellulaire induite par DTX ou PTX (Riccardi et al., 1995). Riccardi et ses collègues montrent une corrélation entre le temps de duplication de l'ADN

et la sensibilité cellulaire au DTX et au PTX. Au plus le cycle est court, au plus la proportion de mort cellulaire observée est grande. Les SH-SY5Y ont un temps de duplication aux alentours de 48 h (résultats non montrés), c'est-à-dire, long par rapport à beaucoup des autres lignées qui cyclent plus vite. La diminution de la prolifération dans les SH-SY5Y est suivie par une augmentation de la mort cellulaire rapportée par la perte de l'intégrité de la membrane plasmique cellulaire mesurée par LDH (Fig 1. graphes à droite). Au vu de nos résultats, nous pouvons classer les drogues en fonction de leur toxicité décroissante : Epo B, DTX, PTX et X/G.

2. Caractérisation de la toxicité induite par la R-roscovitine et le flavopiridol.

Les SH-SY5Y ont été traitées avec la R-roscovitine et le flavopiridol pendant 24 h (veieue la figura 9.2) et on a mesuré les changements dans la viabilité cellulaire par MTS. La R-roscovitine induit un schéma de mort "dose dépendante" avec un maximum à 25 μ M. Le traitement avec flavopiridol induit une diminution de la viabilité inférieure à celle de la R-roscovitine, même aux doses maximales essayées.3. Étude de la synergie résultante du traitement séquentiel au DTX suivi du flavopiridol.

3. Étude de la synergie résultante du traitement séquentiel au DTX suivi du flavopiridol.

Notre choix d'utiliser le DTX parmi les autres TMs afin de reproduire les résultats de potentialisation de la mort dans la lignée des SH-SY5Y repose sur deux arguments. Premièrement, le DTX a montré une puissance cytotoxique supérieure au PTX dans le traitement de certaines lignées murines et humaines (voir les résultats du point 1), qui pourrait s'expliquer par une affinité plus élevée par les microtubules (Riou et al., 1992). Ensuite, parce qu'on a mis en évidence que le flavopiridol potentialise la cytotoxicité induite par le DTX "in vivo" et "in vitro" dans des lignées tumorales gastriques (Motwani et al., 2003).

Le traitement des SH-SY5Y avec le flavopiridol et le DTX pendant 24 h induit une petite diminution de la viabilité ($27,32 \pm 1,14$ % et $18,91 \pm 1,52$ % respectivement). La séquence de traitement DTX suivi du flavopiridol, induit une perte de viabilité ($45,26 \pm 2,43$ %) inférieure au résultat de l'addition des valeurs de mort du flavopiridol 24 h ($27,32 \pm 1,14$ %) et du DTX 24h \rightarrow MSD 24 h ($30,69 \pm 0,93$) séparément. La thérapie séquentielle au DTX suivie du flavopiridol ne présente pas d'effets synergiques dans la lignée neuroblastique des SH-SY5Y. De façon surprenante, nous avons observé que la perte de viabilité des cellules traitées au DTX pendant 24 h et puis traitées au milieu frais pendant 24 h additionnelles ($30,69 \pm 0,93$) est plus élevée que celle des cellules traitées au DTX pendant 24 h ($18,91 \pm 1,52$ %). Ces résultats mettent en évidence que la perte de viabilité induite par le DTX non seulement est dose dépendante, mais aussi que malgré le retrait du traitement, le DTX continue à induire une diminution de la viabilité 24 h plus tard. Sur base

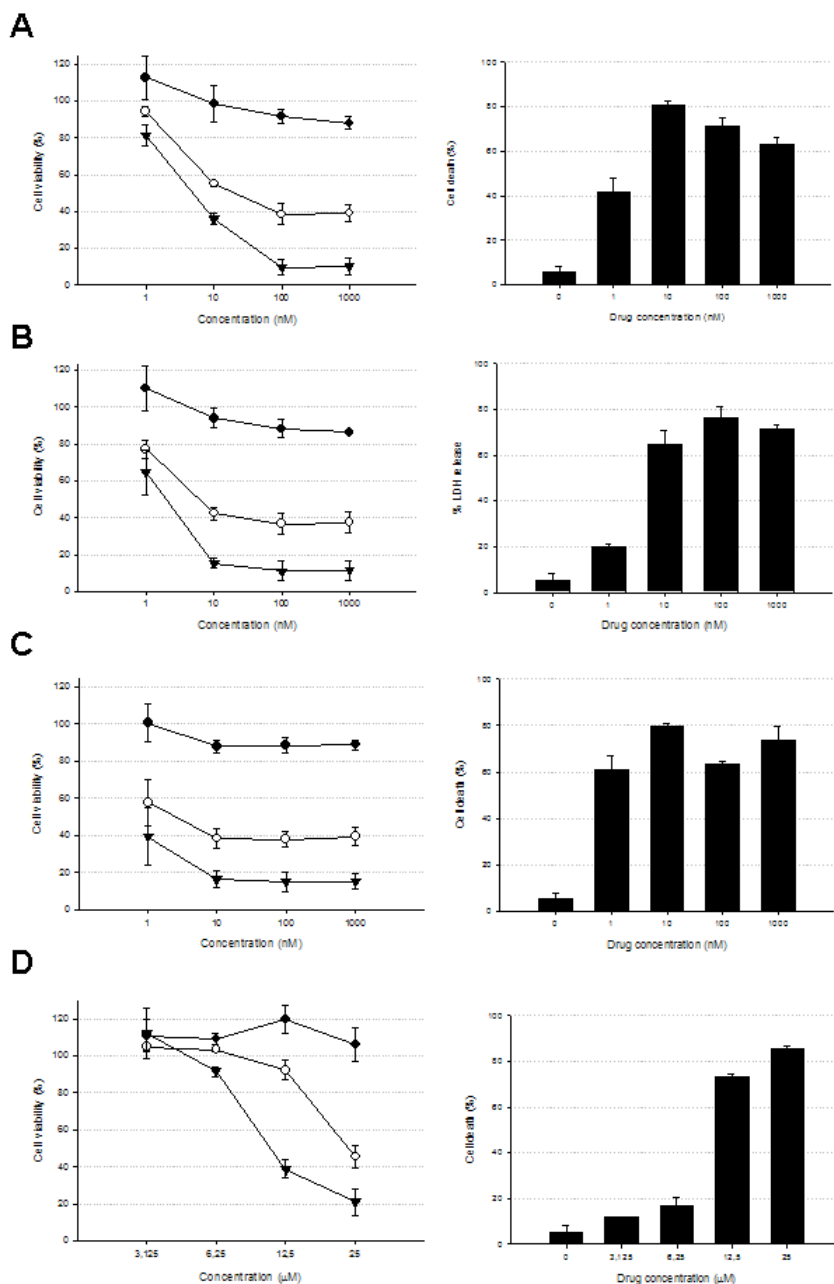


Figura 9.1. Mort cellulaire induite par les inhibiteurs des microtubules. Graphes à gauche : Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec PTX (A), DTX (B), Epo B (C) et X/G (D) aux doses indiquées sur la figure. Les graphes à gauche sont une dose dépendance à 24 h (●), 48 h (○) ou 72 h (▼). Les différences dans la viabilité cellulaire ont été mesurées par MTS. Les pourcentages s’obtiennent en rapportant la valeur de prolifération d’un puits traité à celle d’un contrôle proliférant. Chaque point indique la moyenne ± SEM (standard error media) d’un minimum de 2 expériences indépendantes avec 3 mesures indépendantes par expérience. Graphes à droite : Les cellules SH-SY5Y ont été traitées au PTX (A), DTX (B), Epo B (C) et X/G (D) aux doses indiquées sur les figures pendant 72 h. La mort cellulaire a été mesurée par LDH. Les pourcentages s’obtiennent en rapportant la valeur de libération de LDH d’un puits traité au LDH total d’un puits avec le même traitement. La valeur de chaque barre indique la moyenne ± SEM (standard error media) d’un minimum de 2 expériences indépendantes avec 3 mesures indépendantes par expérience.

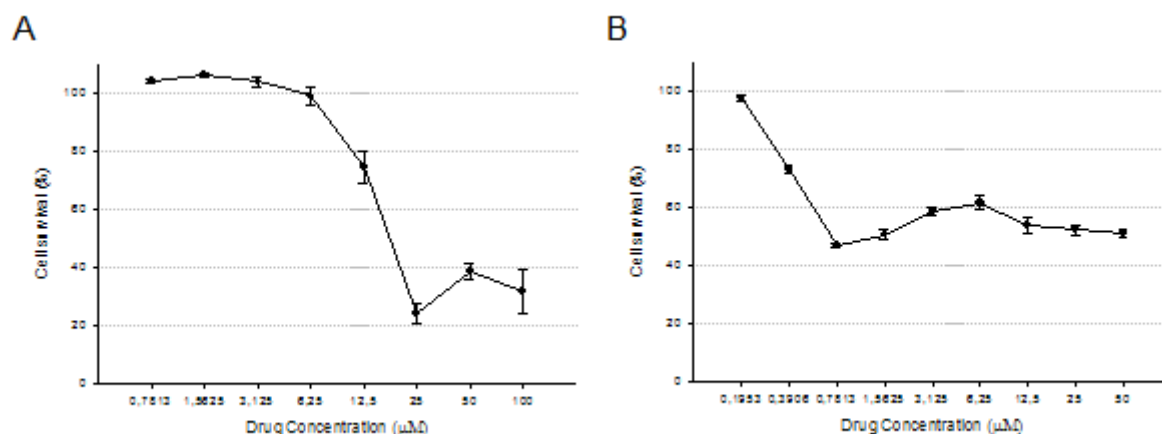


Figura 9.2. Effets de la R-roscovitine et du flavopiridol sur la viabilité cellulaire des SH-SY5Y. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec la R-roscovitine (A) et le flavopiridol (B) aux doses indiquées dans la figure. Après une incubation de 24 h avec les différentes drogues, la viabilité cellulaire a été mesurée par MTS. Les pourcentages s’obtiennent en rapportant la valeur de prolifération d’un puit traité à celle d’un contrôle proliférant. Chaque point indique la moyenne \pm SEM (standard error media) d’un minimum de 2 expériences indépendantes avec 3 mesures indépendantes par expérience.

de ces résultats, nous pouvons affirmer que les cellules SH-SY5Y traitées au DTX réalisent une décision de mourir pendant les 24 premières heures de traitement. Cette décision de mourir, en anglais reçoit le nom de *cell death commitment*.

4. **Étude de la synergie résultante du traitement séquentiel au DTX suivi de la R-roscovitine.** Après les résultats négatifs obtenus avec le flavopiridol plus le DTX, nous avons voulu voir si le manque d’effet pouvait être imputable au flavopiridol et si dans ce cas, nous pouvions contourner ce problème en utilisant un autre inhibiteur de CDKs. Les SH-SY5Y ont été traitées avec une gamme de concentrations de DTX pendant 24 h. Nous avons ensuite aspiré le milieu et ajouté un nouveau milieu contenant de la R-roscovitine à des concentrations si élevées que $10\mu\text{M}$ (comme représenté à la figure 9.3). Les résultats de cette expérience ont mis en évidence que la perte de viabilité était

Taula 9.1. Étude de la synergie induite par la thérapie séquentielle entre le docétaxel et le flavopiridol.

Traitement		Mort Cellulaire
1er jour	2ème jour	100-MTS %
-	F 200 nM	27,32 \pm 1,14
F 200nM	MSD	36,52 \pm 1,09
-	DTX 5 nM	18,91 \pm 1,52
DTX 5 nM	MSD	30,68 \pm 0,93
DTX 5 nM	F 200 nM	45,26 \pm 2,43
F 200 nM	DTX 5 nM	42,233 \pm 0,78

pareille pour toutes les doses de R-roscovitine testées, même celles qui n’ont pas des effets sur la prolifération cellulaire (1 et 3,3 μM).En conclusion, la thérapie séquentielle DTX suivi de la R-roscovitine, n’est pas utile pour augmenter la toxicité induite par le DTX seul dans la lignée des SH-SY5Y. Ensuite, on a voulu tester que la diminution de la viabilité cellulaire se produisait principalement par des effets toxiques du traitement au DTX. Le DTX induit un *cell death commitment* malgré le retrait du milieu traité et l’ajout du milieu frais (comme représenté à la figure 9.4).

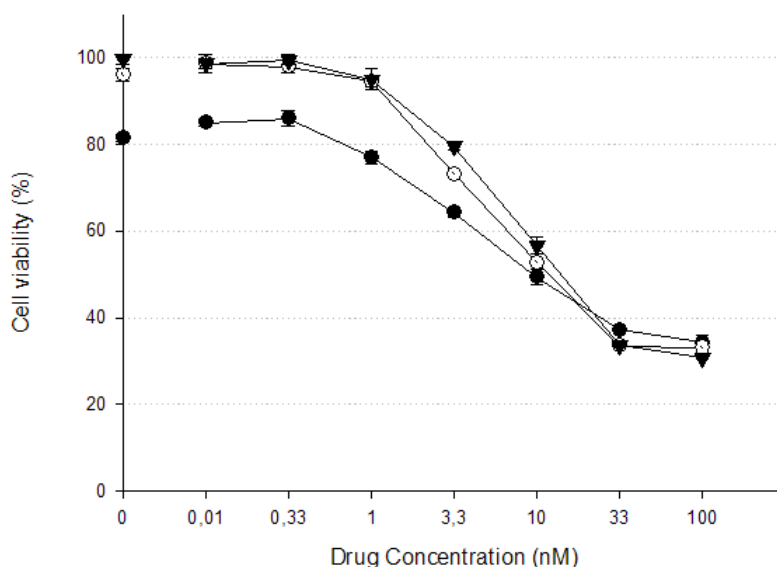


Figura 9.3. La séquence de traitement DTX suivi de la R-roscovitine à des doses aussi élevées que 10 μM ne présente pas de différences de diminution de la viabilité. Les SH-SY5Y ont été traitées pendant 24 h aux doses de DTX indiquées sur la figure (axe des abscisses) plus R-roscovitine 1 μM (▼), 3.3 μM (○) ou 10 μM (●). Les symboles sur l’axe des ordonnées indiquent le traitement avec la R-roscovitine seule aux doses précitées. La viabilité des cellules a été mesurée par la méthode du MTS. Chaque point est la moyenne \pm SEM (*standard error media*) de 2 expériences indépendantes avec 3 déterminations indépendantes par expérience.

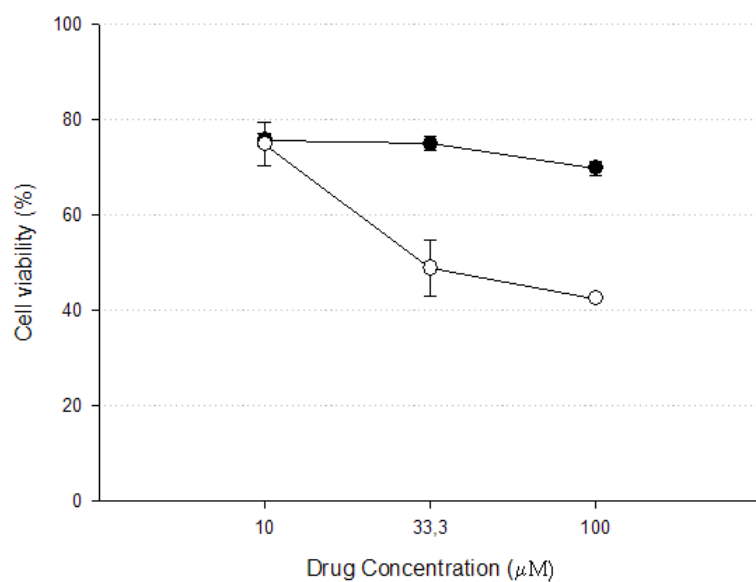


Figura 9.4. Effets toxiques du DTX. Les SH-SY5Y ont été traitées aux concentrations de DTX indiquées sur la figure (axe des abscisses) pendant 24 h (●) ou 24 h additionnelles dans du milieu frais après la retraite du traitement (○). La viabilité des cellules a été mesurée par la méthode du MTS. Chaque point est la moyenne \pm SEM (*standard error media*) de 2 expériences indépendantes avec 3 déterminations indépendantes par expérience.

V – DISCUSSIÓ

LA IDENTIFICACIÓ DE LA CASPASA X.

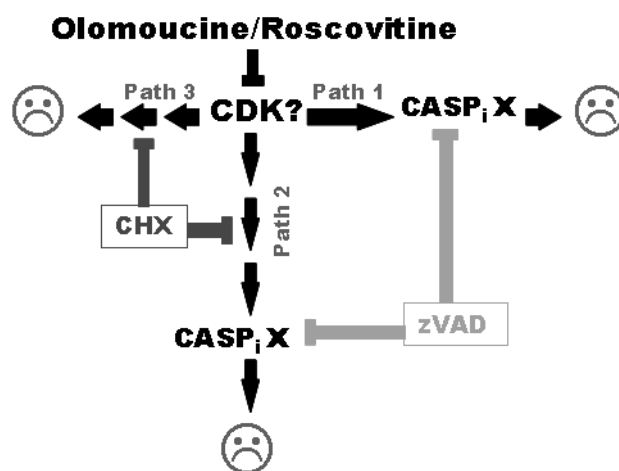


Figura 10.1. Esquema de les possibles vies responsables de la mort cel·lular en les SH-SY5Y tractades amb olomoucina o roscovitina. Les tres vies es defineixen a través dels efectes sinèrgics entre la CHX i el z-VAD-fmk. Cada via defineix una subpoblació específica de la línia cel·lular neuroblàstica. La nostra hipòtesi de treball és que cada subpoblació reflecteix un conjunt de cèl·lules en una fase concreta del cicle. La inhibició d'una o més CDKs és el fet detonador de l'inici de les tres vies. Formuleu l'hipòtesi que aquestes CDKs són la CDK1 i/o la CDK2. La CASP_i simbolitza una caspasa iniciadora. X és el número desconegut d'aquesta o aquestes caspases.

Considerem que quan en el tractament amb un fàrmac, les cèl·lules es comporten com si fos una via extrínseca de tipus I, significa que es produeix una forta activació d'una caspasa iniciadora independent de la via mitocondrial (veieu la figura 3.4). Els resultats del nostre grup amb les SH-SY5Y, tractades amb olomoucina i roscovitina, suggereixen l'existència d'una caspasa iniciadora diferent de la CASP8 i de la 10. La bibliografia descriu diferents vies apoptòtiques desencadenades en orgànuls cel·lulars a través de l'activació de caspases iniciadores; aquest és el cas de les apoptosis que comencen a l'aparell de Golgi o al reticle endoplasmàtic (RE) per mecanismes independents de l'apoptosoma (veieu l'apartat 3.5). En cèl·lules d'origen murí, la CASP12 està associada al RE i s'activa en resposta a l'estrès de l'orgànul (Nakagawa et al., 2000). El gen de la CASP12 conté un codó de stop al final del prodomini en poblacions caucàsiques i asiàtiques, fet que origina una forma de la proteïna truncada incapaç d'induir apoptosi (Fischer et al., 2002). Per aquest motiu, hem pensat que una proteïna homòloga a la CASP12

murina podria estar iniciant la cascada de caspases. Alguns autors han evidenciat per Western-blot l'existència d'una banda que reacciona amb l'anticòs de la CASP12 (Nakagawa et al., 2000; Rao et al., 2001). Aquesta banda és present en les SH-SY5Y però s'ha observat que no és proteolitzada en resposta a l'estrès del RE (Dahmer, 2005). D'altra banda, s'ha suggerit que, en humans, un altre membre de la família de les caspases podria suplir la CASP12. Per exemple, s'ha vist que en les línies tumorals Hela i SK-N-SH, la CASP4 es troba associada al RE i s'activa en resposta a estrès d'aquest orgànel (Hitomi et al., 2004; Katayama et al., 2004). En vista dels nostres resultats, formulem la hipòtesi que les fosforilacions mitjançades per les CDKs, podrien estar inhibint directa o indirectament l'activació d'almenys dues caspases apicals a les que anomenem $CASP_iX$ (veieu la figura 10.1). Els fàrmacs inhibidors de CDKs induirien el desbloqueig d'aquest fre, fet que es traduiria per l'activació d'aquestes CASPs i la conseqüent apoptosi. L'existència d'una cascada de CASPs iniciada al nucli ens sembla una hipòtesis altament versemblant ja que és l'orgànel on les CDKs de cicle exerceixen la seua funció.

S'ha demostrat que, en determinades condicions, la CASP6 nuclear actua com una caspasa iniciadora. Per exemple, s'ha vist que pot ser activada per p84N5, una proteïna implicada en el *checkpoint* de G2/M (Doostzadeh-Cizeron et al., 2000; Doostzadeh-Cizeron et al., 2001). D'altra banda, es sap que les làmines són un substrat de tall específic de la CASP6. Resultats del nostre laboratori mostren que el tall de les làmines amb olomoucina i roscovitina es produeix a les 6 hores de tractament (resultats no mostrats en aquesta tesi) mentre que, per exemple, amb la STS, el fenomen s'observa a les 12h (Yuste et al., 2002). Aquests resultats suggereixen que l'activació de la CASP6 és primerenca. Malauradament, hem observat que la inhibició de la CASP6 amb z-VEID-fmk, un inhibidor dissenyat contra la CASP6, no frena la mort en el nostre paradigma experimental.

Un model alternatiu d'apoptosi iniciada al nucli és el de la survivina. S'ha vist que, en cèl·lules mitòtiques, aquesta proteïna està formant un complex inhibitori amb la CASP9. La formació d'aquest complex requereix d'una fosforilació realitzada per la CDK1 sobre la survivina (O'Connor et al., 2000). La survivina regula l'activació de la CASP9 durant la mitosi. Segons els nostres propis resultats, les SH-SY5Y presenten un temps de duplicació de 48 hores en fase exponencial. Després d'un temps de tractament de 24 h, moment al qual es mesura la mort, aproximadament un 50 % de les cèl·lules hauran realitzat la mitosi. Per tant, al nostre grup pensem que aquesta via de mort podria explicar la via 1 i/o la via 2 de mort representades a l'esquema (un 40 % de cèl·lules són rescatades per un paninhibidor de caspases com el z-VAD-fmk, segons els nostres resultats de la figura 10.1).

Alternativament, s'ha descrit que la CASP2 pot activar-se en resposta a diversos danys com ara l'estrès genotòxic, l'estimulació amb TNF o diversos virus i patògens. La CASP2, a diferència de les altres caspases, s'ha situat al Golgi i al nucli. Aquesta darrera localització és altament interessant ja que

la CASP2 nuclear pot ser activada a través d'estrés genotòxic per una via dependent de p53 (Tinel et al., 2004). La p53 activada augmenta els nivells de PIDD, una proteïna amb *death domain*. La formació de complexos entre PIDD, RAIDD i CASP2 promou l'activació espontània de la caspasa i la sensibilització a la mort apoptòtica induïda per genotoxines (Tinel i Tschopp, 2004). No s'ha descrit que la CASP2 proteolitzi altres caspases com poden fer la resta de caspases iniciadores, en canvi es sap que indueix apoptosi a través de l'alliberament de proteïnes pro-apoptòtiques del mitocondri i que requereix la presència de caspasa-9 per induir apoptosi (Guo et al., 2002). D'altra banda, es sap que la CASP2 està localitzada al Golgi però es desconeix el mecanisme d'activació. La manera com CASP2 inicia la mort a mitocondri és un tema controvertit. Entre les diferents hipòtesis trobem: el tall proteolític de BID (Guo et al., 2002), o bé, l'acció directa sobre el mitocondri (Guo et al., 2002; Enoksson et al., 2004). En ambdós casos, la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-X_L frenen l'apoptosi (Guo et al., 2002). En canvi, Robertson et al. (2005) evidencien que la CASP2 sense activitat proteolítica és capaç d'induir la permeabilització del mitocondri independentment de la sobreexpressió de Bcl-2, i àdhuc, en cèl·lules Bax -/- Bak -/-. La CASP2 és la única de la família que exigeix un aminoàcid concret en la posició 5 abans de l'aspàrtic de tall. En concret s'ha vist que la seqüència de tall més específica és VDVAD. Alguns treballs han mostrat que la CASP2 no és inhibible amb el pan-inhibidor de caspases z-VAD-fmk però en canvi, és altament sensible als efectes inhibitoris del z-VDVAD-fmk. Un fet rellevant pel nostre treball és que s'ha descrit que la CASP2 s'expressa a les SH-SY5Y i que és completament funcional en resposta a estímuls com la taspigargina (Dahmer, 2005), la STS o UCN-01 (Lopez i Ferrer, 2000). En el nostre paradigma experimental, tant la via 1 com la 2, són inhibibles per z-VAD-fmk, en canvi, la via 3 és una possible candidata per la CASP2. És més, el fet que la síntesi de proteïnes sigui necessària per l'apoptosi a la via 3, ens suggereix que proteïnes que requereixen una síntesi "de novo", per exemple PIDD, podrien estar vehiculitzant l'activació de la cascada apoptòtica. Futurs estudis de l'activació de la CASP2 en el nostre paradigma experimental serien recomanables, per exemple, a través de la monitorització "in vivo" de substrats específics de tall, com la golgina-160 o la PKC δ (Troy i Shelansky, 2003).

A més de la transcripció de PIDD, l'activació de p53 pot augmentar els nivells d'altres proteïnes proapoptòtiques que expliquin el mecanisme de mort dels nostres fàrmacs. L'olomoucina i la roscovitina activen la proteïna p53 (Zhu et al., 2004). Malgrat s'hagi observat que aquests fàrmacs tenen una lleugera preferència a l'hora d'induir apoptosi per les línies amb un p53 funcional (Krystof et al., 2005; McClue et al., 2002), també s'ha descrit que són tòxiques en línies sense p53. Els nostres propis resultats amb la línia HL-60, que no expressa p53, corroboren aquestes observacions (veieu l'apartat 8.5). Les DL₅₀ de l'olomoucina i la roscovitina en aquesta línia (190 i 60 μ M respectivament) estan dins del mateix ordre de magnitud que els valors obtinguts per les SH-SY5Y (127,5 i 25 μ M respectivament, Ribas i Boix, 2004). La pifitrina α és un inhibidor reversible de p53 (Komarov et al., 1999). Malauradament, experiments del

nostre grup ens han dut a pensar que la pifitrina α és un compost poc estable en cultiu (resultats no mostrats en aquesta tesi). Conseqüentment, no hem pogut realitzar assajos dels efectes de la inhibició farmacològica de p53 com en principi preteníem. Tanmateix, les nostres observacions suggereixen que p53 no és necessari per l'apoptosi en el nostre model. Aquesta afirmació es recolza en resultats propis obtinguts en les SH-SY5Y tractades amb un estímul inductor de la via p53, la nutlina-3. Les SH-SY5Y sobreexpressores de Bcl- X_L frenen la mort enfront la nutlina-3, mentre que són incapaces d'aturar la mort en resposta a l'olomoucina o la roscovitina. Aquest comportament diferencial sembla posar de manifest que el mecanisme apoptòtic subjacent és també divergent.

Finalment, a pesar de les evidències experimentals, és possible que l'olomoucina i la roscovitina estiguin actuant per la via mitocondrial. Això no obstant, pensem que aquest punt és poc probable ja que durant els nostres experiments sempre hem controlat els efectes protectors de Bcl- X_L amb l'estaurosporina, un inductor clàssic de la via mitocondrial. L'estaurosporina, com l'olomoucina i la roscovitina, és un inhibidor de proteïna cinases, però es diferencia per presentar un espectre d'inhibició molt més ampli, per lo que és considerat un inhibidor general i inespecífic. Malgrat l'ús de controls pels nostres treballs, la literatura suggereix que no tots els membres apoptòtics de la família de Bcl-2 tenen la mateixa capacitat per inhibir el gran ventall d'estímuls que passen per la via intrínseca. Les *BH3 only* són les proteïnes reguladores apicals de la cascada apoptòtica mitocondrial, i s'activen en resposta a múltiples estímuls. Recentment, Chen et al. (2005) han evidenciat que no tots els *BH3 only* són equivalents a l'hora d'interaccionar amb els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 (veieu la figura 10.2). Els resultats de Chen et al. (2005) evidencien que els perfils d'unió de Bcl- X_L , Bcl-2 i Bcl-w són similars, sent els de Bcl- X_L i Bcl-w els més propers, mentre que els de Mcl-1 i A1 són més diferents. Sota aquesta perspectiva, la nostra hipòtesi és que el tractament amb olomoucina i roscovitina podria estar induint l'expressió d'un *BH3 only* que burlaria els efectes anti-apoptòtics de Bcl-2 i Bcl- X_L . Per descartar aquest punt, ens caldria sobreexpressar, al nostre model, una proteïna anti-apoptòtica amb un perfil inhibidor diferent al de Bcl-2 o Bcl- X_L . Una bona candidata és Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*). Mcl-1 és essencial durant l'embriogènesi i el manteniment dels limfòcits T i B en animals, al mateix temps s'ha vist que és sobreexpressada en molts models tumorals. A nivell estructural, conté els dominis BH1-3 i un domini transmembrana que li permet localitzar-se a les membranes de diferents orgànuls, entre ells el mitocondri. Els nivells proteics de Mcl-1 són variables i presenta diversos nivells de regulació. A nivell post-transcripcional, és destacable la vida mitja curta del seu ARNm (aproximadament de 40 minuts). A nivell post-traducciona, es coneix que la proteïna és tallada per les caspases. El fragment carboxi-terminal originat té activitat pro-apoptòtica, i es creu que participa en un bucle de retroalimentació positiva responsable d'una segona onada d'activació de les caspases. Finalment, Mcl-1 és degradada a nivell del proteasoma (revisat per Michels et al., 2005). Disminucions dels nivells de Mcl-1 han estat descrites com l'esdeveniment apical

que desencadena l'apoptosi. Per exemple, en cèl·lules de mieloma múltiple, el flavopiridol (Gojo et al., 2002) i la R-roscovitina (MacCallum et al., 2005) indueixen la disminució de Mcl-1 i la subsegüent apoptosi. Tanmateix, els treballs de Nijhawan et al. (2003) evidencien que la caiguda dels nivells de Mcl-1 en cèl·lules Hela sobreexpressores de Bcl-X_L, no és suficient per desencadenar l'apoptosi en resposta a l'irradiació amb UV. Per tant, pensem que si aquest resultat es generalitza, la sobreexpressió de Mcl-1 no ens donaria una resposta cel·lular diferent de la que ja hem obtingut sobreexpressant Bcl-X_L.

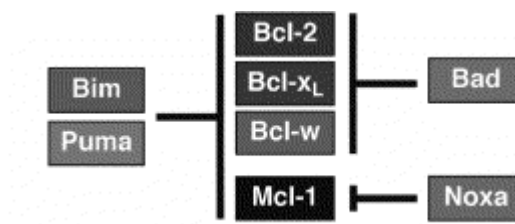


Figura 10.2. Model de la diferent afinitat dels BH3 only per diversos membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 (Chen et al., 2005). Els estudis "in vivo" i "in vitro" de l'afinitat d'unió de diversos *BH3 only* utilitzats com lligam més les anàlisis complementàries de l'associació de proteïnes en models cel·lulars, indiquen que la majoria dels *BH3 only* presenten preferències a l'hora d'inhibir membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2.

Es desconeix amb precisió com les proteïnes *BH3 only* i els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 regulen l'activació de Bax i Bak (Green i Kroemer, 2004). Les proteïnes Bax o Bak, dos membres de la família de Bcl-2 amb dominis BH1-BH3, són necessàries per desencadenar la mort per la via intrínseca clàssica (Lindsten et al., 2000; Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001). Quan s'activen, permeabilitzen la membrana mitocondrial externa, alliberant-se així, els factors pro-apoptòtics necessaris per l'activació de la cascada de caspases (Green i Kroemer, 2004). Per aquest motiu, pensem que per descartar definitivament la via mitocondrial ens caldria assajar els efectes de l'olomoucina i la roscovitina sobre les SH-SY5Y carents de Bax i Bak.

IDENTIFICACIÓ DE LA CDK DIANA D'AQUESTS FÀRMACS I DELS MECANISMES SUBSEGÜENTS QUE DUEN A L'APOPTOSI

L'olomoucina i la roscovitina exhibeixen una gran potència per inhibir "in vitro" la CDK1, 2, 5, 7 i 9. La funció de CDK3 durant la transició de G0 a G1 ve tot just d'ésser descrita (Ren i Rollins, 2004), per lo que els derivats de purines encara no han estat ben estudiats sobre l'activitat d'aquesta cinasa.

La CDK1 i la CDK2 es troben entre les dianes amb unes IC₅₀ menors enfront de l'olomoucina i de la roscovitina (consulteu la taula 11.1). Aquestes dues CDKs estan implicades en la progressió del cicle cel·lular, i a més, es sap que la CDK1 és capaç de suplir a la CDK2 en absència d'aquesta (Aleem et al., 2005; Bashir i Pagano, 2005). En vista d'aquests treballs, la nostra hipòtesi és que la inhibició combinada de CDK1 i CDK2 és el mecanisme responsable de la inducció d'apoptosi a les SH-SY5Y. Per testar aquesta hipòtesi, caldria observar les diferències en la mortalitat de cultius de SH-SY5Y on aquestes CDKs presentessin una funció o expressió reduïda. Una de les formes més fisiològiques d'aturar el cicle i la funció de les CDKs lligada a ell, és la pròpia diferenciació. Les SH-SY5Y tractades amb RA (*reti-*

Taula 11.1. Taula de les IC₅₀ (μM) de l'olomoucina i la roscovitina enfront de les seues principals dianes.

	OLOMOUCINA	ROSCOVITINA	R-ROSCOVITINA
CDK1	7,7	0,65	0,35
CDK2	3	0,7	0,40
CDK3		1,5	
CDK5		0,16	0,20
CDK7	10	0,5	
CDK9		0,6	
ERK1/ 2	50/40	34/14	25/20
DYRK1a		3,1	11

noic acid) es diferencien cap a un fenotip neuronal (Nicolini et al., 1998). Aquesta diferenciació indueix uns canvis a nivell morfològic, bioquímic i funcional. El nou fenotip es caracteritza, a nivell visual, per l'aparició de neuritogènesi. A nivell bioquímic, la diferenciació de les SH-SY5Y s'ha correlacionat amb l'augment de p21, p27 i TrkB mentre que el nivell de les ciclines D, E i de la CDK1, 2 i 4, es mantenen constants (Liu et al., 2004). Els mateixos autors han suggerit que l'augment de la forma hipofosforilada de Rb durant la diferenciació és atribuïble a la inhibició directa dels complexos CDKs/ciclina a través de l'augment dels seus inhibidors fisiològics, p21 i p27. Concretament, mostren que la cinètica dels nivells de p21 experimenta diverses onades de creixement. Aquest fet coincideix amb les onades de guany de resistència a l'olomoucina i la roscovitina durant els cinc dies de diferenciació (Ribas i Boix, 2004). P21 és un membre de la família de les proteïnes CIP/KIP. A través de la unió a complexos CDKs/ciclina, p21 inhibeix l'activitat de la CDK2, i, en menor proporció, de la CDK1. Les evidències experimentals suggereixen que l'expressió de p21 podria ser la responsable de la resistència a la mort durant la diferenciació. Els mecanismes protectors de p21 podrien consistir en, d'una banda, merament frenar l'activació de la CDK1 i de la CDK2, però alternativament, podria actuar directament com una proteïna antiapoptòtica. Alguns autors suggereixen que la forma citoplasmàtica de p21 indueix supervivència (revisat per Coqueret, 2003). En un model de mort en resposta a Fas, s'ha vist que el p21 del citoplasma actua com un mecanisme de resistència a través de la unió a la proCASP3, impeding d'aquesta manera, la seua proteòlisi i activació (Suzuki et al., 1998). Finalment, no descartem que la resistència de les SH-SY5Y diferenciades, sigui atribuïble a mecanismes anti-apoptòtics engegats paral·lelament a la diferenciació. Per exemple, s'ha descrit que, quan les SH-SY5Y són diferenciades amb RA, augmenten els nivells de Bcl-2 i disminueixen els de p53. Aquests esdeveniments provoquen una menor vulnerabilitat cel·lular enfront de diferents estímuls (Tieu et al., 1999).

Tot i l'existència de resultats que qüestionen la importància de la CDK2 per la proliferació de models tumorals (Tetsu i McCormick, 2003), o fins i tot, que mostren que els MEFs CDK2 -/- i els salvatges presenten percentatges de supervivència similar en resposta a la R-roscovitina (Bach et al., 2005), nosaltres pensem que la inhibició d'aquesta cinasa juntament amb la d'altres, és la responsable de la mort al nostre paradigma experimental. La literatura més recent, proposa que CDK1 és la cinasa vicariant de CDK2 (Bashir i Pagano, 2005). Aquests resultats suggereixen que la inhibició de CDK2 i CDK1 podrien induir mort. Això no obstant, un altre mecanisme, en absolut exclouent de l'anterior, és possible. Aquest mecanisme es basa en la inhibició de les CDKs amb funció transcripcional, concretament la CDK7, 8, 9 i 11 (revisat a Loyer et al., 2005). La CDK8 pot ser obviada com a diana perquè és molt poc sensible als anàlegs de purina (Schang et al., 2002) i la CDK11 ha estat descrita recentment, per la qual cosa poc podem discutir encara dels seus efectes enfront dels inhibidors farmacològics a l'abast.

La CDK7 ha estat implicada en la transcripció, concretament en el pas de la iniciació a l'elongació del ARNm, i alternativament en l'activació d'altres CDKs a través de la formació del complex CAK. La CDK 9 té un paper clau en la fase d'elongació del ARNm. Ambdues CDKs actuen a través de la fosforilació de l'extrem carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Loyer et al., 2005). Les IC₅₀ "in vitro" de l'olomoucina i la roscovitina per la CDK7 són 10 i 0,5 μM respectivament (Wang et al., 2001b; Schang et al., 2002; Bach et al., 2005). Només l'IC₅₀ de la roscovitina enfront la CDK9 ha estat determinada, i el valor màxim obtingut en diversos assajos és de 0,6 μM (Bach et al., 2005; Wang et al., 2001b).

En el nostre paradigma experimental, la inhibició general de la síntesi de proteïnes s'havia mostrat ineficaç per induir apoptosi (Ribas i Boix, 2004), dit d'una altra manera, les SH-SY5Y no presentaven un model *release* de mort (veieu la discussió de l'article 1). L'extrapolació d'aquestes evidències als resultats amb olomoucina i roscovitina, indicaven que la inhibició de la transcripció en resposta a les drogues no era la responsable de l'apoptosi. És més, els nostres resultats havien sigut molt clars: la CHX rescatava de la mort induïda per olomoucina o roscovitina. Això no obstant, el desconeixement de l'abast del fre transcripcional imposat pels inhibidors de CDKs, segueix fent interessant la inhibició de la transcripció en el nostre model de mort. La literatura referent als inhibidors farmacològics de CDKs frenant la transcripció és extensa. Per exemple, Ljungman i Paulsen (2001) havien demostrat que en dos models en cultiu diferents la roscovitina inhibia la síntesi de RNA en aproximadament un 70-80%, i que la transcripció del 20-30% remanent, no era inhibida a pesar d'augmentar la dosi. Als treballs de Lan et al. (2001), la comparació dels efectes inhibidors de la transcripció del flavopiridol respecte els de la roscovitina, mostraven que el flavopiridol era un bon inhibidor general de la transcripció mentre que la roscovitina era més selectiva. Les evidències suggerien que aquests efectes del flavopiridol eren deguts a la inhibició de la CDK9 (Lan et al., 2001). En aquest sentit, s'ha vist que els anàlegs de purina es mostren efectius inhibint la CDK9 "in vitro" (Schang et al., 2002), però existeixen evidències de que no s'uneixen a la CDK9 "in vivo" (Wang et al., 2001b). Treballs realitzats sobre models cel·lulars infectats per virus, han evidenciat que l'olomoucina i la roscovitina frenen la transcripció de l'agent infeccios sense disminuir paral·lelament els nivells de certes proteïnes de l'hoste (Schang et al., 2001). Whittaker et al. (2004) mostren que al seu model la R-roscovitina disminueix l'ARNm de la ciclina B1, A i D mentre que els nivells del factor de transcripció c-fos augmenten. Anteriorment, David-Pfeuty (1999) havia demostrat que els nivells proteics de la ciclina A i la E deuen en resposta al tractament amb roscovitina. El tractament amb roscovitina es correlaciona amb la disminució de proteïnes implicades en supervivència, per exemple, XIAP i survivina (Kim et al., 2004) o àdhuc Mcl-1 (MacCallum et al., 2005). Els nostres propis resultats evidencien una disminució dels nivells proteics de ciclina D1 i β-catenina en resposta al tractament amb olomoucina o roscovitina, però en canvi també hem observat la inducció de proteïnes com p21 en resposta a l'activació de p53 per la R-roscovitina.

En funció dels anteriors punts, hem de modificar la nostra conclusió. Ara tenim en compte que el bloqueig transcripcional dels inhibidors farmacològics de CDKs pot ser parcial i selectiu. Plantegem que l'olomoucina i la roscovitina podrien induir apoptosi a través de la inhibició específica d'un grup de gens, entre els quals probablement es troben els de supervivència. Els treballs de Lan et al. (2001) sobre la taxa de renovament de l'ARNm a escala genòmica, han evidenciat que l'estabilitat d'un ARNm pot estar relacionada amb la seua funció. D'aquesta manera, els ARNm més làbils són els de gens induïts en resposta a l'activació de les vies de senyalització, els reguladors d'apoptosi i del cicle cel·lular. En vista d'això, pensem que seria molt interessant estudiar com l'olomoucina i la roscovitina afecten els patrons d'expressió genètica pel procediment de *microarrays*.

Malgrat tot, del Prete et al. (2002) evidencien que fenòmens de degradació precoç dels ARNm citoplasmàtics poden ser considerats un tret característic de la inducció d'apoptosi. Aquests resultats ens alerten sobre la dificultat d'estudiar canvis en els nivells d'ARNm en models apoptòtics. Tanmateix, existeixen models cel·lulars on olomoucina i roscovitina no indueixen apoptosi i que permetrien aquests tipus d'anàlisis transcripcional. Recordem que en els resultats de Whittaker et al. (2004) es descriu una disminució de l'ARNm de la ciclina A, B i D1 en cèl·lules tractades amb R-roscovitina que no entren en apoptosi.

DIANES ALTERNATIVES

Un diana alternativa d'aquests fàrmacs és DYRK1a (*dual-specificity, tyrosine-regulated protein kinase*). Per exemple, la roscovitina inhibeix DYRK1a amb una IC_{50} de 3,1 μ M (Bain et al., 2003). La família de les cinases DYRK és estructuralment similar a la de les CDKs. La funció d'aquestes proteïnes a nivell fisiològic és poc coneguda, però algunes evidències proporcionades per un gen homòleg a *Drosophila melanogaster*, suggereixen un paper en el desenvolupament del sistema nerviós. S'ha vist que en una línia neuronal de l'hipocamp, DYRK1a s'uneix, fosforila i activa el factor de transcripció CREB (Yang et al., 2001). La relació d'aquesta cinasa amb el sistema nerviós, fa que en el nostre model cel·lular neuronal sigui interessant contemplar aquesta cinasa com a hipotètica diana inductora de mort cel·lular. Una evidència en contra de la implicació de DYRK1a és la proporcionada per un model de cèl·lules granulars del cerebel capaces d'engagar l'apoptosi en resposta a l'olomoucina o a la roscovitina. En aquest model, la inhibició específica de DYRK1a amb epigallocatecina no desencadenava apoptosi (Monaco et al., 2004).

Alternativament, la bibliografia recent sobre la R-roscovitina planteja una diana interessant d'aquests fàrmacs: la cinasa de piridoxal (PDXK). Aquest enzim catalitza la fosforilació de les tres formes de la vitamina B6 (el pirodoxal, la piridoxamina i la piridoxina) en presència d'ATP i de Zn^{2+} . Aquesta fosforilació és un pas bàsic per a la síntesi de pirodoxal 5-fosfat (PLP), la forma intracel·lular activa de la vitamina B6, un cofactor enzimàtic per al menys 140 enzims. És més, la PDXK està implicada en funcions del sistema nerviós ja que molts neurotransmissors són sintetitzats a través de reaccions que precisen del cofactor PLP. S'ha descrit que la R-roscovitina s'uneix al lloc d'unió del substrat de la PDXK, i que, per tant, en aquest cas no competeix amb l'ATP per la inhibició de l'enzim (Tang et al., 2005). L'aparició d'inhibidors de PDXK selectius, ens ajudaria a esbrinar els possibles efectes tòxics de la inhibició d'aquesta cinasa a les SH-SY5Y.

VI – REFERÈNCIES

- Abal M, Andreu JM, Barasoain I** (2003) Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets.* 3(3):193-203.
- Abrams JM, White MA** (2004) Coordination of cell death and the cell cycle: linking proliferation to death through private and communal couplers. *Curr Opin Cell Biol.* 16(6):634-8.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW** (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 9(2):423-32.
- Adams JM, Cory S** (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 14(6):715-20.
- Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R, Wahl GM** (1998) ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol.* 8(3):145-55.
- Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P** (2005) Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol.* 7(8):831-6
- Altieri DC** (2001) The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 7(12):542-7.
- Altieri DC** (2003) Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res.* 88:31-52.
- Altzauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thurig C, Schmid I, Conway EM, Schoni MH, Vogt P, Mueller C, Fey MF, Zangemeister-Wittke U, Simon HU** (2004) Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med.* 199(10):1343-54.
- Aprelikova O, Xiong Y, Liu ET** (1995) Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J Biol Chem.* 270(31):18195-7.
- Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH** (1999) Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 19(3):1751-8.
- Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schachtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L** (2005) Roscovitine targets: Protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem.* 280(35):31208-19
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P** (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J.* 371(Pt 1):199-204.
- Ball KL, Lain S, Fahraeus R, Smythe C, Lane DP** (1997) Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Curr Biol.* 7(1):71-80.
- Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME** (2003) The death effector domain protein family. *Oncogene.* 22(53):8634-44.
- Bartkova J, Zemanova M, Bartek J** (1996) Expression of CDK7/CAK in normal and tumor cells of diverse histogenesis, cell-cycle position and differentiation. *Int J Cancer.* 66(6):732-7.
- Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y, Zimmerberg J, Youle RJ** (1999) Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5492-7.
- Bashir T, Pagano M** (2005) Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nat Cell Biol.* 7(8):779-81.
- Becher B, Barker PA, Owens T, Antel JP** (1998) CD95-CD95L: can the brain learn from the immune system? *Trends Neurosci.* 21(3):114-7.
- Becker F, Murthi K, Smith C, Come J, Costa-Roldan N, Kaufmann C, Hanke U, Degenhart C, Baumann S, Wallner W, Huber A, Dedier S, Dill S, Kinsman D, Hediger M, Bockovich N, Meier-Ewert S, Kluge AF, Kley N** (2004) A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. *Chem Biol.* 11(2):211-23.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR** (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2(8):469-75.
- Beroud C, Soussi T** (2003) The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat.* 21(3):176-81.
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P** (2003) Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol.* 13(20):1775-85.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI** (1997) Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(4):1172-6.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Finenberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Green-**

- gard P** (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*. 402(6762):669-71.
- Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A** (2003) Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*. 278(33):31401-11.
- Blagosklonny MV** (2002) Sequential activation and inactivation of G2 checkpoints for selective killing of p53-deficient cells by microtubule-active drugs. *Oncogene*. 21(41):6249-54.
- Blagosklonny MV** (2003) Matching targets for selective cancer therapy. *Drug Discov Today*. 8(24): 1104-7.
- Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z** (2002) Cyclotherapy: protection of normal cells and unshielding of cancer cells. *Cell Cycle*. 1(6):375-82.
- Blagosklonny MV, Pardee AB** (2001) Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res*. 61(11):4301-5.
- Boatright, KM, Deis C, Denault J.-B, Sutherlin DP and Salvesen GS** (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIPL. *Biochem. J*. 382, 651-657
- Boix J, Llecha N, Yuste VJ, Comella JX** (1997) Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology*.36(6):811-21.
- Borner C** (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 39(11):615-47.
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR** (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*. 17(1):37-49.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A** (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*. 286(5445):1735-8.
- Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A** (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*. 415(6874):922-6.
- Bratton SB, Cohen GM** (2001) Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci*. 22(6):306-15.
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G** (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*.11(9):3155-62.
- Brooks CL, Gu W** (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 15(2):164-71.
- Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT, El-Deiry WS** (2003) Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol*. 23(16):5556-71.
- Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL** (1987) Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet*. 13(3):235-44.
- Calegari F, Huttner WB** (2003) An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci*. 116(Pt 24):4947-55.
- Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G** (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*. 23(8):1514-21.
- Caron de Fromental C, Soussi T** (1992) TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*.4(1):1-15.
- Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K** (1999) Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene*. 18(11):1935-44.
- Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP** (2003) Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci*. 116(Pt 14):2987-98.
- Castedo M, Ferri KF, Blanco J, Roumier T, Larochette N, Barretina J, Amendola A, Nardacci R, Metivier D, Este JA, Piacentini M, Kroemer G** (2001) Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin-associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J Exp Med*. 194(8):1097-110.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G** (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*.23(16):2825-37.
- Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastri PR** (2004) Upregulation of survivin in G2/M cells and

- inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia*. 6(1):29-40.
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X** (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J*. 22(16):4132-42.
- Chao C, Hergenbahn M, Kaeser MD, Wu Z, Saito S, Iggo R, Hollstein M, Appella E, Xu Y** (2003) Cell type- and promoter-specific roles of Ser18 phosphorylation in regulating p53 responses. *J Biol Chem*. 278(42):41028-33. Epub 2003 Aug 08.
- Chen F, Hersh BM, Conradt B, Zhou Z, Riemer D, Gruenbaum Y, Horvitz HR** (2000) Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* 287(5457):1485-9.
- Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J** (1998) Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(1):195-200.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC** (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 17(3):393-403.
- Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA** (2001) Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*. 276(33):30724-8.
- Chen YN, Sharma SK, Ramsey TM, Jiang L, Martin MS, Baker K, Adams PD, Bair KW, Kaelin WG Jr** (1999) Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8):4325-9.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ** (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 8(3):705-11.
- Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC** (2004) Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat Res*. 162(3):270-86.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R** (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 380(6574):548-50.
- Collins SJ** (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 70(5):1233-44.
- Coqueret O** (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 13(2):65-70.
- Craig AL, Burch L, Vojtesek B, Mikutowska J, Thompson A, Hupp TR** (1999) Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J*. 342 (Pt 1):133-41.
- Cui H, Schroering A, Ding HF** (2002) p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*. 1(9):679-86.
- Dahmer MK** (2005) Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*. 80(4):576-83.
- Dai Y, Dent P, Grant S** (2002) Induction of apoptosis in human leukemia cells by the CDK1 inhibitor CGP74514A. *Cell Cycle*. 1(2):143-52.
- Daujat S, Neel H, Piette J** (2001) MDM2: life without p53. *Trends Genet*. 17(8):459-64.
- Davidoff AM, Pence JC, Shorter NA, Iglehart JD, Marks JR** (1992) Expression of p53 in human neuroblastoma- and neuroepithelioma-derived cell lines. *Oncogene*. 7(1):127-33.
- David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y, Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D** (2001) Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene*. 20(42):5951-63.
- De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH** (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*. 243(1-2):518-26.
- De Kroon AI, Koorengel MC, Goerdal SS, Mulders PC, Janssen MJ, de Kruijff B** (1999) Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (method). *Mol Membr Biol*. 16(2):205-11.
- Del Prete MJ, Robles MS, Guao A, Martinez-A C, Izquierdo M, Garcia-Sanz JA** (2002) Degradation of cellular mRNA is a general early apoptosis-induced event. *FASEB J*. 16(14):2003-5.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC** (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 17(8):2215-23.

- Dixon H, Norbury CJ** (2002) Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function. *Cell Cycle*. 1(6):362-8.
- Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC** (2004) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*. 279(33):34087-90.
- Doostzadeh-Cizeron J, Yin S, Goodrich DW** (2000) Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with Caspase-6 and NF- κ B activation. *J. Biol. Chem*. 275, 25336-25341.
- Doostzadeh-Cizeron J, Terry HHA, Goodrich DW** (2001) The nuclear death domain protein p84N5 activates a G2/M cell cycle checkpoint prior to the onset of apoptosis. *J. Biol. Chem*. 276, 1127-1132.
- Druker BJ** (2002) Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell*. 1(1):31-6.
- 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.
- Dulic V, Lees E, Reed SI** (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*. 257(5078):1958-61.
- Dynlacht BD** (2005) E2F and p53 make a nice couple: converging pathways in apoptosis. *Cell Death Differ*. 12(4):313-4.
- Edamatsu H, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F** (2000) Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene*. 19(27):3059-68.
- Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, Brodeur GM** (2001) Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res*. 61(4):1314-9.
- Elez R, Piiper A, Kronenberger B, Kock M, Brendel M, Hermann E, Pliquett U, Neumann E, Zeuzem S** (2003) Tumor regression by combination antisense therapy against Plk1 and Bcl-2. *Oncogene*. 22(1):69-80.
- Elledge SJ, Harper JW** (1998) The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1377(2):M61-70.
- Enoksson M, Robertson JD, Gogvadze V, Bu P, Kropotov A, Zhivotovsky B, Orrenius S** (2004) Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem*. 279(48):49575-8.
- Espinosa JM, Emerson BM** (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*. 8(1):57-69.
- Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lelias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ** (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*. 23(3):329-36.
- Ferri KF, Kroemer G** (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 3(11):E255-63.
- Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E** (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 293(2):722-6.
- Fischer PM, Endicott J, Meijer L** (2003a) Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Prog Cell Cycle Res*. 5:235-48.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K** (2003b) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10(1):76-100.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T** (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 416(6880):560-4.
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M** (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol*. 153(5):999-1010.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ** (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1(4):515-25.
- Fridman JS, Lowe SW** (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 22(56):9030-40.
- Fukuda S, Mantel CR, Pelus LM** (2004) Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood*. 103(1):120-7.
- Fukuda S, Pelus LM** (2004) Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 1(5):322-6.

- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhat-tacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Si-cinski P** (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114(4):431-43.
- Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ** (1998) A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 17(24):7209-18.
- Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC** (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 62(9):2462-7.
- Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S** (2001) Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem.* 276(22):19066-71.
- Gojo I, Zhang B, Fenton RG** (2002) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res.* 8(11):3527-38.
- Golsteyn RM** (2005) Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett.* 217(2):129-38.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D** (1997) CASH, a novel caspase homologue with death effector domains *J Biol Chem.* 272(32):19641-4.
- Gondeau C, Gerbal-Chaloin S, Bello P, Aldrian-Herrada G, Morris MC, Divita G** (2005) Design of a novel class of peptide inhibitors of cyclin-dependent kinase/cyclin activation. *J Biol Chem.* 280(14):13793-800.
- Gray N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L** (1999) ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem.* 6(9):859-75.
- Green DR, Evan GI** (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell.* 1(1):19-30.
- Green DR, Kroemer G** (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8(7):267-71.
- Green DR, Kroemer G** (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004 Jul 30;305(5684):626-9.
- Greenhalf W, Stephan C, Chaudhuri B** (1996) Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 380(1-2):169-75.
- Grim JE, Clurman BE** (2003) Cycling without CDK2?. *Trends Cell Biol.* 2003 Aug;13(8):396-9.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ** (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13(15):1899-911.
- Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES** (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem.* 277(16):13430-7. Epub 2002 Feb 06.
- Hakem A, Sasaki T, Koziaradzki I, Penninger JM** (1999) The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J Exp Med.* 189(6):957-68.
- Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L** (1997) MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21):11333-8.
- Hansen TM, Nagley P** (2003) AIF: a multifunctional cog in the life and death machine. *Sci STKE.* 2003 (193):PE31
- Harbour JW, Dean DC** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14(19):2393-409.
- Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH** (1997) Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science.* 278(5340):1064-8.
- Harvey KJ, Lukovic D, Ucker DS** (2000) Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol.* 148(1):59-72.
- Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, Adams JM, Huang DC** (2000) Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol.* 149(3):623-34.
- Havlicek L, Hanus J, Vesely J, Leclerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M** (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem.* 40(4):408-12.
- Hicks SW, Machamer CE** (2005) Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1744(3):406-14.
- Hill MM, Adrain C, Martin SJ** (2003) Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv.* 3(1):19-26.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imai-zumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M** (2004) Involvement

- of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 165(3):347-56.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ** (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 348(6299):334-6.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M** (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem.* 277(5):3247-57. Epub 2001 Nov 19.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC** (1991) p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(5015):49-53.
- Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bouloud KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N** (2000) Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60(16):4315-9.
- Hsu SL, Yin SC, Liu MC, Reichert U, Ho WL** (1999) Involvement of cyclin-dependent kinase activities in CD437-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 252(2):332-41.
- 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):17255-7.
- Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G** (1998) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 273(50):33489-94.
- Huang DC, Strasser A** (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 103(6):839-42.
- Humbert S, Dhavan R, Tsai L** (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 113 (Pt 6):975-83.
- Hussain SP, Harris CC** (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58(18):4023-37.
- Ibrado AM, Kim CN, Bhalla K** (1998) Temporal relationship of CDK1 activation and mitotic arrest to cytosolic accumulation of cytochrome C and caspase-3 activity during Taxol-induced apoptosis of human AML HL-60 cells. *Leukemia.* 12(12):1930-6.
- Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G** (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(20):10717-22.
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A** (2000) High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 19(5):617-23.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP** (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* 20(6):1331-40.
- Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM** (2003) Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J Cell Sci.* 116(Pt 20):4095-106.
- Jiang X, Wang X** (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 73:87-106.
- Jimenez GS, Khan SH, Stommel JM, Wahl GM** (1999) p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene.* 18(53):7656-65.
- Jones JM, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, Davies E, Hajnoczky G, Saunders TL, Van Keuren ML, Fernandes-Alnemri T, Meisler MH, Alnemri ES** (2003) Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature.* 425(6959):721-7.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A** (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 378(6553):206-8.
- Jordan MA, Wilson L** (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 4(4):253-65.
- 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):549-54.
- Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S, Evan G** (2002) c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22(17):6158-69.
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D** (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene.* 20(26):3449-55.
- Kastan MB, Bartek J** (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 432(7015):316-23.

- Kastan MB, Zambetti GP** (2003) Paracrine p53 in the cytoplasm. *Cell*. 112(1):1-2.
- Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M** (2004) Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*. 28(1-2):67-78.
- Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E** (1992) Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst*. 84(22):1736-40.
- Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS** (2004a) Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*. 23(2):446-56.
- Kim S, Kang J, Qiao J, Thomas RP, Evers BM, Chung DH** (2004b) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *J Pediatr Surg*. 39(4):516-21.
- Kim SG, Kim SN, Jong HS, Kim NK, Hong SH, Kim SJ, Bang YJ** (2001) Caspase-mediated Cdk2 activation is a critical step to execute transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene*. 20(10):1254-65.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A** (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*. 276(49):46639-46.
- Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, Matsumoto H, Suzuki-Takahashi I, Kokubo T, Higashi H, Saitoh S, Taya Y, Yasuda H, et al** (1993) Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene*. 8(9):2425-32.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL** (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419(6905):367-74.
- Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grelhier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JE, Le Roch K, Doerig C, Schultz P, Meijer L** (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol*. 7(6):411-22.
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L** (2002a) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*. 23(9):417-25.
- Knockaert M, Lenormand P, Gray N, Schultz P, Pouyssegur J, Meijer L** (2002b) p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene*. 21(42):6413-24.
- Knockaert M, Meijer L** (2002c) Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem Pharmacol*. 64(5-6):819-25.
- Ko LJ, Prives C** (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 10(9):1054-72.
- Kobet E, Zeng X, Zhu Y, Keller D, Lu H** (2000) MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(23):12547-52.
- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM** (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 257(5077):1689-94.
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV** (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. 285(5434):1733-7.
- Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A** (2002) Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell*. 9(5):1005-16.
- Koshkin V, Greenberg ML** (2000) Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J*. 347 Pt 3:687-91.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S** (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*. 21(24):8247-54.
- Krystof V, McNae IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Muller P, Vojtesek B, Orsag M, Havlicek L, Strnad M** (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci*. 62(15):1763-71.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD** (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 111(3):331-42.
- Kuwana T, Newmeyer DD** (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 15(6):691-9.
- Larochelle S, Pandur J, Fisher RP, Salz HK, Suter B** (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev*. 12(3):370-81.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y** (2002) Re-

- quirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. 297(5585):1352-4.
- Leist M, Jaattela M** (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(8):589-98.
- Lens SM, Wolthuis RM, Klomp maker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema RH** (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J*. 22(12):2934-47.
- Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH, Giangrande P, Wu L, Saavedra HI, Field SJ, Thompson MA, Yang H, Fujiwara Y, Greenberg ME, Orkin S, Smith C, Nevins JR** (2001) Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol Cell*. 8(1):105-13.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA** (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 351(6326):453-6.
- Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH** (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*. 371(6496):423-6.
- Li BS, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Jaffe H, Kulkarni AB, Pant HC** (2002) Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J*. 21(3):324-33.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J** (1998b) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94(4):491-501.
- Li F** (2003) Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 197(1):8-29.
- Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC** (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol*. 1(8):461-6.
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC** (1998a) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 396(6711):580-4.
- 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):1389-99.
- Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, Li F** (2004) Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *J Biol Chem*. 279(15):15196-203.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X** (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86(1):147-57.
- Liu Y, Encinas M, Comella JX, Aldea M, Gallego C** (2004) Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21(Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*. 24(7):2662-72.
- Ljungman M, Paulsen MT** (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol Pharmacol*. 60(4):785-9.
- Lolli G, Johnson LN** (2005) CAK -Cyclin-Dependent Activating Kinase: A Key Kinase in Cell Cycle Control and a Target for Drugs? *Cell Cycle*. 4(4).
- Lopez E, Ferrer I** (2000) Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res*. 85(1-2):61-7.
- Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K** (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol*. 22(1):31-4.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM** (2005) Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal*. 17(9):1033-51.
- Lu W, Chen L, Peng Y, Chen J** (2001) Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene*. 20 (25):3206-16.
- Lu W, Pochampally R, Chen L, Traidej M, Wang Y, Chen J** (2000) Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function. *Oncogene*. 19(2):232-40.
- 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):481-90.
- Maag RS, Mancini M, Rosen A, Machamer CE** (2005) Caspase-resistant Golgin-160 disrupts apoptosis induced by secretory pathway stress and ligation of death receptors. *Mol Biol Cell*. 16(6):3019-27.
- MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP, Green SR** (2005) Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of

Mcl-1. *Cancer Res.* 65(12):5399-407.

MacLachlan TK, El-Deiry WS (2002) Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(14):9492-7.

Maecker HL, Koumenis C, Giaccia AJ (2000) p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4638-44.

Makela TP, Parvin JD, Kim J, Huber LJ, Sharp PA, Weinberg RA (1995) A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11):5174-8.

Makin G, Dive C (2003) Recent advances in understanding apoptosis: new therapeutic opportunities in cancer chemotherapy. *Trends Mol Med.* 9(6):251-5.

Malgrange B, Knockaert M, Belachew S, Nguyen L, Moonen G, Meijer L, Lefebvre PP (2003) The inhibition of cyclin-dependent kinases induces differentiation of supernumerary hair cells and Deiters' cells in the developing organ of Corti. *FASEB J.* 17(14):2136-8

Malumbres M, Carnero A (2003) Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 5:5-18.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298(5600):1912-34.

Mapelli M, Massimiliano L, Crovace C, Seeliger MA, Tsai LH, Meijer L, Musacchio A (2005) Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J Med Chem.* 48(3):671-9.

Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature.* 419(6907):634-7.

Martin A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2005) Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell.* 7(6):591-8.

Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 22(11):2729-40.

Massague J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 432(7015):298-306.

Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y (2003) E2F1 and c-Myc in cell growth and death. *Cell Cycle.* 2(4):333-8.

Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI (2000) Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(26):14317-22.

Maude SL, Enders GH (2005) Cdk inhibition in human cells compromises chk1 function and activates a DNA damage response. *Cancer Res.* 65(3):780-6.

McInnes C, Andrews MJ, Zheleva DI, Lane DP, Fischer PM (2003) Peptidomimetic design of CDK inhibitors targeting the recruitment site of the cyclin subunit. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents.* 3(1):57-69.

Meijer L (1996) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in CELL BIOLOGY.* vol 6:393-97.

Meijer L (2000) Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents. *Drug Resist Updat.* 3(2):83-88.

Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem.* 243(1-2):527-36.

Meijer L, Raymond E (2003) Roscovitine and other Purines as Kinase Inhibitors. From Starfish Oocytes to Clinical Trials. *Acc Chem Res.* 36(6):417-25.

Mendelsohn AR, Hamer JD, Wang ZB, Brent R (2002) Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(10):6871-6.

Mendoza N, Fong S, Marsters J, Koeppen H, Schwall R, Wickramasinghe D (2003) Selective cyclin-dependent kinase 2/cyclin A antagonists that differ from ATP site inhibitors block tumor growth. *Cancer Res.* 63(5):1020-4.

Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 277(47):45162-71.

Michels J, Johnson PW, Packham G (2005) Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(2):267-71.

Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol.* 140(3):627-36.

Minn AJ, Boise LH, Thompson CB (1996) Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev.* 10(20):2621-31.

Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, As-

- har H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S (2002) Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 21(17):2613-22.
- Mitra J, Enders GH (2004) Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene*. 23(19):3361-7.
- Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G (1995) Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(10):4407-11.
- Moll UM, Riou G, Levine AJ (1992) Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(15):7262-6.
- Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*. 26(15):3453-9.
- Momand J, Wu HH, Dasgupta G (2000) MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 242(1-2):15-29.
- Monaco EA 3rd, Beaman-Hall CM, Mathur A, Vallano ML (2004) Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochem Pharmacol*. 67(10):1947-64.
- Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*. 378(6553):203-6.
- Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2001) A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c. *EMBO J*. 20(4):661-71.
- Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM (1999) Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(17):9683-8.
- Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E (2004) Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279(48):50375-81.
- Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*. 3(6):552-8.
- Morris MC, Gondeau C, Tainer JA, Divita G (2002) Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex. Key role of the C-lobe of the Cdk. *Biol Chem*. 277(26):23847-53.
- Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK (1999) Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 5(7):1876-83.
- Motwani M, Rizzo C, Sirotinak F, She Y, Schwartz GK (2003) Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2(6): 549-55.
- Mulzer J, Martin HJ (2004) Lessons learned from macrolide synthesis. *Chem Rec*. 3(5):258-70.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*. 13(19):2490-501.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 85(6):817-27.
- Nabha SM, Mohammad RM, Dandashi MH, Coupayer-Gerard B, Aboukameel A, Pettit GR, Al-Katib AM (2002) Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Clin Cancer Res*8(8):2735-41.
- Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Barsagi D, Lowe SW (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol*. 4(11):859-64.
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Hayashi S, Hosoda M, Todo S, Nakagawara A (2003) Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 197(1-2):105-9.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98 -103.
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 7(3):683-94.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 112(4):481-90.
- Nguyen L, Malgrange B, Rocher V, Hans G, Moonen

- G, Rigo JM, Belachew S** (2003) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases control proliferation, apoptosis and differentiation of oligodendroglial cells. *Int J Dev Neurosci.* 21(6):321-6.
- Nicholls P** (1974) Cytochrome c binding to enzymes and membranes. *Biochim Biophys Acta.* 346(3-4):261-310.
- Nicolini G, Miloso M, Zoia C, Di Silvestro A, Cavaletti G, Tredici G** (1998) Retinoic acid differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells: an in vitro model to assess drug neurotoxicity. *Anticancer Res.* 18(4A):2477-81.
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X** (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 17(12):1475-86
- Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W** (2003) Paracitoplasmic anchor for p53. *Cell.* 112(1):29-40.
- Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H** (2004) Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 23(39):6548-58.
- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC** (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13103-7.
- O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC** (2002) A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell.* 2(1):43-54.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N** (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288(5468):1053-8.
- Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U** (2000) A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 60(11):2805-9.
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M** (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet.* 35(1):25-31.
- Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W** (2001) Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 276(41):38061-7.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S** (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(3):1259-63.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al** (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 15(6):3032-40.
- Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML** (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci.* 19(20):8747-56.
- Paglini G, Peris L, Diez-Guerra J, Quiroga S, Caceres A** (2001) The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep.* 2(12):1139-44
- Parant JM, Lozano G** (2003) Disrupting TP53 in mouse models of human cancers. *Hum Mutat.* 21(3):321-6.
- Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B** (2003) Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* 22(18):4794-803.
- Park DS, Farinelli SE, Greene LA** (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of postmitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem.* 271(14):8161-9.
- Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C** (2002) Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem.* 277(17):15147-61.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH** (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 402(6762):615-22.
- Pelengaris S, Khan M, Evan GI** (2002) Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell.* 109(3):321-34.
- Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G** (1999) Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell.* 3(5):565-77.
- Peter ME** (2004) The flip side of FLIP. *Biochem J.* 382(Pt 2):e1-3.
- Peter ME, Krammer PH** (2003) The CD95(APO-1)/Fas DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10(1):26-35.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G** (2001) Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome

- c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett.* 509(3):435-8.
- Pines J, Hunter T** (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature.* 346(6286):760-3.
- Poncet D, Larochette N, Pauleau AL, Boya P, Jalil AA, Cartron PF, Vallette F, Schnebelen C, Bartle LM, Skaltskaya A, Boutolleau D, Martinou JC, Goldmacher VS, Kroemer G, Zamzami N** (2004) An anti-apoptotic viral protein that recruits Bax to mitochondria. *J Biol Chem.*
- Poon RY, Yamashita K, Howell M, Ershler MA, Belyavsky A, Hunt T** (1994) Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15. *J Cell Sci.* 107 (Pt 10):2789-99.
- Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P** (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):755-63.
- Putchu GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM** (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron.* 29(3):615-28.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A** (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 3(3):287-96.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE** (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 11(4):372-80.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE** (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 276(36):33869-74.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Dugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G** (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 3(9):839-43.
- Ren S, Rollins BJ** (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.* 117(2):239-51.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS** (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14250-5.
- Rialet V, Meijer L** (1991) A new screening test for antimetabolic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res.* 11(4):1581-90.
- Riccardi A, Servidei T, Tornesello A, Puggioni P, Mastangelo S, Rumi C, Riccardi R** (1995) Cytotoxicity of paclitaxel and docetaxel in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer.* 31A(4):494-9.
- Rideout HJ, Wang Q, Park DS, Stefanis L** (2003) Cyclin-dependent kinase activity is required for apoptotic death but not inclusion formation in cortical neurons after proteasomal inhibition. *J Neurosci.* 23(4):1237-45.
- Riou JF, Naudin A, Lavelle F** (1992) Effects of Taxotere on murine and human tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 187(1):164-70.
- Robertson JD, Gogvadze V, Kropotov A, Vakifahmetoglu H, Zhivotovsky B, Orrenius S** (2004) Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep.* 5(6):643-8.
- Robertson JD, Zhivotovsky B, Gogvadze V, Orrenius S** (2003) Outer mitochondrial membrane permeabilization: an open-and-shut case? *Cell Death Differ.* 10(5):485-7.
- Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC** (2001) APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61(18):6660-4.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD** (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat.* 4(5):303-13.
- Rosania GR, Merlie J Jr, Gray N, Chang YT, Schultz PG, Heald R** (1999) A cyclin-dependent kinase inhibitor inducing cancer cell differentiation: biochemical identification using *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(9):4797-802.
- Rossi DJ, Londesborough A, Korsisaari N, Pihlak A, Lehtonen E, Henkemeyer M, Makela TP** (2001) Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking Mat1. *EMBO J.* 20(11):2844-56.
- Roucoux X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC** (2002) Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.* 368(Pt 3):915-21.
- Roumier T, Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G** (2003) Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1321-9.
- Roux D, Hadi HA, Thoret S, Guenard D, Thoison O, Pais M, Sevenet T** (2000) Structure-activity rela-

- onship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia puyifera* on the tubulin/microtubule system. *J Nat Prod*. 63(8):1070-6.
- Rowinsky EK, Donehower RC** (1995) Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*. 332(15):1004-14.
- Ruffolo SC, Shore GC** (2003) BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):25039-45. 29.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES** (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2(8):476-83.
- Sausville EA** (2002) Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol Med*. 8(4 Suppl):S32-7.
- Salvesen GS, Dixit VM** (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):10964-7.
- Salvesen GS, Duckett CS** (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(6):401-10.
- Sawyers CL** (2002) Finding the next Gleevec: FLT3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 1(5):413-5.
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS** (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 4(11):842-9.
- Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME** (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem*. 274(32):22532-8.
- Schang LM, Bantly A, Knockaert M, Shaheen F, Meijer L, Malim MH, Gray NS, Schaffer PA** (2002) Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *J Virol*. 76(15):7874-82.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB** (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. 277(5698):665-7.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW** (2002) Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell*. 1(3):289-98.
- Schuler M, Green DR** (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 29(Pt 6):684-8.
- Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD, Morgan DO, Meijer L, Vesely J, Kim SH** (1995) Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*. 22(4):378-91.
- Schutte B, Nieland L, van Engeland M, Henfling ME, Meijer L, Ramaekers FC** (1997) The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res*. 236(1):4-15.
- Schwartz GK, Farsi K, Maslak P, Kelsen DP, Spriggs D** (1997) Potentiation of apoptosis by flavopiridol in mitomycin-C-treated gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 3(9):1467-72.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ** (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 300(5616):135-9.
- Senderowicz AM** (2000) Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene*. 19(56):6600-6.
- Senderowicz AM** (2003) Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene*. 22(42):6609-20.
- Senderowicz AM** (2004) Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol*. 16(6):670-8.
- Senoo M, Manis JP, Alt FW, McKeon F** (2004) p63 and p73 are not required for the development and p53-dependent apoptosis of T cells. *Cancer Cell*. 6(1):85-9.
- Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC** (1993) Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature*. 363(6427):371-4.
- Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B** (2001) Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem*. 79(2):426-36.
- Shen SC, Huang TS, Jee SH, Kuo ML** (1998) Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 9(1):23-9.
- Sherr CJ, Roberts JM** (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 18(22):2699-711.
- Shibata Y, Nishimura S, Okuyama A, Nakamura T** (1996) p53-independent induction of apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibition. *Cell Growth Differ*

- fer. 7(7):887-91.
- 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):483-7.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y** (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*. 11(2):519-27.
- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV** (1997) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*. 6(6):751-63.
- Sluss HK, Armata H, Gallant J, Jones SN** (2004) Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol Cell Biol*. 24(3):976-84.
- Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW** (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 284(5411):156-9.
- Song Z, Yao X, Wu M** (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 278(25):23130-40. Epub 2003 Mar 26.
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H** (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*. 21(17):4520-30.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES** (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*. 1(7):949-57.
- Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES** (1996) The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem*. 271(43):27099-106.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES** (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 410(6824):112-6.
- Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS** (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*. 276(5):3149-57.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM** (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*. 18(6):1660-72.
- Stommel JM, Wahl GM** (2004) Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J*. 23(7):1547-56. Epub 2004 Mar 18.
- Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT** (2004) Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*. 64(7):2502-8.
- Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM** (2002) Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem*. 277(13):11345-51.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G** (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 192(4):571-80.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Abersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G** (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397(6718):441-6.
- Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K** (2000) Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene*. 19(29):3225-34.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M** (1998) Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene*. 17(8):931-9.
- Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T** (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*. 78(4):703-11.
- Tang L, Li MH, Cao P, Wang F, Chang WR, Bach S, Reinhardt J, Ferandin Y, Galons H, Wan Y, Gray N, Meijer L, Jiang T, Liang DC** (2005) Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J Biol Chem*. 280(35):31220-31229
- Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ** (2001) Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an impor-

- tant component of programmed cell death. *J Mol Med.* 79(8):428-36.
- Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ** (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 6(5):529-35.
- Tetsu O, McCormick F** (2003) Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell.* 3(3):233-45.
- Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbrook DC, Vassilev LT** (2004) Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 279(51):53015-22.
- Tieu K, Zuo DM, Yu PH** (1999) Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res.* 58(3):426-35.
- Tinel A, Tschopp J** (2004) The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress. *Science.*
- Troy CM, Shelanski ML** (2003) Caspase-2 redux. *Cell Death Differ.* 10(1):101-7.
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E** (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature.* 371(6496):419-23.
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM** (1985) Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature.* 315(6017):340-3.
- Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF** (2003) Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem.* 278(10):8468-75.
- Van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B** (1997) Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res.* 235(2):421-30.
- Vander Heiden MG, Thompson CB** (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1(8):E209-16.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chianilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D** (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 9(2):267-76.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM** (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335(6189):440-2.
- Vaux DL, Silke J** (2003) HtrA2/Omi, a sheep in wolf's clothing. *Cell.* 115(3):251-3.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL** (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102(1):43-53.
- Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S, et al.** (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem.* 224(2):771-86.
- Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson L, Brosard J, Brodeur GM, Pelletier J, Gros P** (1993) Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 53(21):5269-73.
- Von Ahse O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD** (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol.* 150(5):1027-36.
- Vousden KH, Lu X** (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2(8):594-604.
- Wang D, de la Fuente C, Deng L, Wang L, Zilberman I, Eadie C, Healey M, Stein D, Denny T, Harrison LE, Meijer L, Kashanchi F** (2001b) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Virol.* 75(16):7266-79.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ** (2001c) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(24):13884-8.
- Wang Q, Xie S, Chen J, Fukasawa K, Naik U, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Jhanwar-Uniyal M, Dai W** (2002a) Cell cycle arrest and apoptosis induced by human Polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity. *Mol Cell Biol.* 22(10):3450-9.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D** (2002b) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 298(5598):1587-92.
- Wang XQ, Ongkeko WM, Lau AW, Leung KM, Poon RY** (2001a) A possible role of p73 on the modulation of p53 level through MDM2. *Cancer Res.* 61(4):1598-603.
- Wallace-Brodeur RR, Lowe SW** (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci.* 55(1):64-75.
- Wallenfang MR, Seydoux G** (2002) cdk-7 Is required

for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(8):5527-32.

Wasylyk C, Salvi R, Argentini M, Dureuil C, Delumeau I, Abecassis J, Debussche L, Wasylyk B (1999) p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53. *Oncogene*. 18(11):1921-34.

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):319-28.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. 14(16):2060-71.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292(5517):727-30.

Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P (2004) The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res*. 64(1):262-72.

Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG, Bhalla K (2003) Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. *Cancer Res*. 63(1):93-9.

Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Bruck W, Massie B, Nalbantoglu J (2003) Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J Neurochem*. 85(3):635-44.

Wright ME, Han DK, Hockenbery DM (2000) Caspase-3 and inhibitor of apoptosis protein(s) interactions in *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *FEBS Lett*. 481(1):13-8.

Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G, el-Deiry WS (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*. 17(2):141-3.

Wu L, Chen P, Hwang JJ, Barsky LW, Weinberg KI, Jong A, Starnes VA (1999) RNA antisense abrogation of MAT1 induces G1 phase arrest and triggers apoptosis in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 274(9):5564-72.

Wu L, Chen P, Shum CH, Chen C, Barsky LW, Weinberg KI, Jong A, Triche TJ (2001) MAT1-modulated CAK activity regulates cell cycle G(1) exit. *Mol Cell Biol*. 21(1):260-70.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*. 7(7A):1126-32.

Wu Z, Earle J, Saito S, Anderson CW, Appella E, Xu Y (2002) Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 22(8):2441-9.

Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A (2004) Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis *J Exp Med*. 199(1):69-80.

Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*. 279(5358):1954-8.

Yu Q, Sicinski P (2004) Mammalian cell cycles without cyclin E-CDK2. *Cell Cycle*. 3(3):292-5.

Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, Encinas M, Bayas-cas JR, Boix J, Comella JX (2002) The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *Neurochem*. 80(1):126-39.

Yamaguchi H, Paranawithana SR, Lee MW, Huang Z, Bhalla KN, Wang HG (2002) Epothilone B analogue (BMS-247550)-mediated cytotoxicity through induction of Bax conformational change in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 62(2):466-71.

Yang EJ, Ahn YS, Chung KC (2001) Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem*. 276(43):39819-24.

Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science*. 281(5381):1355-7.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*. 9(9):680-4.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 7(3):673-82.

- Yuste VJ, Bayascas JR, Llecha N, Sanchez-Lopez I, Boix J, Comella JX** (2001) The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 276(25):22323-31.
- Zaika A, Marchenko N, Moll UM** (1999) Cytoplasmically "sequestered" wild type p53 protein is resistant to Mdm2-mediated degradation. *J Biol Chem.* 274(39):27474-80.
- Zangemeister-Wittke U, Simon HU** (2004) An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle.* 3(9):1121-3.
- Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ** (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science.* 290(5497):1761-5.
- Zhang J, Krishnamurthy PK, Johnson GV** (2002) Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem.* 81(2):307-13.
- Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods WG, Findley HW** (2002) DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 303(1):124-31.
- Zhu Y, Alvarez C, Doll R, Kurata H, Schebye XM, Parry D, Lees E** (2004) Intra-S-phase checkpoint activation by direct CDK2 inhibition. *Mol Cell Biol.* 24(14):6268-77.
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB** (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 162(1):59-69.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X** (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90(3):405-13.
- Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik SW, Wu JC, Tomaselli KJ, Armstrong RC** (2003) Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J Biol Chem.* 278(10):8091-8.

VII – ABREVIATURES

$\Delta\Psi$	Inner Mitochondrial Membrane Potencial
Aa	aminoàcid
AD	Alzheimer disease
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AIF	Apoptosis inducing factor
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC	Anaphase Promoting Complex
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ASPP	Apoptosis-stimulating proteins of p53
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	adenosina 5'-trifosfat
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BH	Bcl-2 Homology
Bin1	box-dependent Myc-interacting protein 1
CAD	Caspase-3-activated DNase
CAK	cyclin-dependent kinase activating kinase
CARD	Caspase Recruitment Domain
CASP	Caspasa
CBM	Cyclin binding motif
CDK	Cyclin-dependent Kinase
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CHX	Cicloheximida
CKI	CDK inhibitor
CRADD	Caspase and RIP adaptor with death domain
CrmA	Cytokine response modifier A
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
CTD	Carboxi Terminal Domain
Cyt c	Cytochrom c
DAct	Actinomicina D
DBD	DNA binding domain

DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DIP	Death-inducing protein
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DN	Dominant negative
DR	Death Receptor
DTX	Docetaxel
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
eIF2α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
Epo B	Epothilone B
Erk	Extracellular Regulated Kinase
FAD	Flavine adenine nucleotide
FADD	FLICE-associated Death Domain
FLIP	FLICE-like Inhibitory Protein
GF	Growth Factor
Glu	Glutàmic
GTP	guanosina 5'-trifosfat
HBXIP	hepatitis B X-interacting protein
HtrA/Omi	High Temperature Requirement protein A
IAP	Inhibitor of Apoptosis protein
IBM	IAP-binding motif
ICAD	CAD inhibitor
INCENP	innere protein centromere
INK4	CDK4 Inhibitors
JUNK	Jun N-terminal Kinase
KDa	KiloDalto
Leu	Leucina
MAP	Microtubule associated protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mat1	Ménage à trois 1
Max	Myc-associated factor X
Mcl1	Myeloid cell leukaemia-1

MDa	MegaDalton
MDM-2	Mouse double minute-2 1
MEF	Mouse embryonic Fibroblast
MLS	Mitochondrial localisation signal
MMP	Mythocondrial Membrane Permeabilization
Mnd2	Motor Neuron Degeneration 2
MPF	Mitosis Promoting Factor
Myt1	membrane associated and tyrosine/threonine specific 1
NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucleotid
NBD	Nucleotide binding domain
NGF	Neuronal Growth Factor
OD	Oligomerisation domain
P75NTR	p75 Neurotrophin receptor
PAK2	P21-activated kinase 2
Parc	P53-associated parkin-like cytoplasmatic protein
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PCD	Programmed Cell Death
PDXK	Pyridoxal kinase
PEN	Antennapedia
PI3K	fosfatidil inositol 3 cinasa
PIDD	p53-induced protein with a DD
Plk	Polo-like kinase
PLP	Pirodoxal 5-fosfat
PP2A	Protein phosphatase 2A
PS	Phosphatidil Serin
PT	Permeability transition
PTX	Paclitaxel
PUMA	P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RA	Retinoic acid
RAIDD	Receptor-interacting protein (RIP)-associated
Rb	Retinoblastoma Protein
RIP	RPA interacting protein
RIP-1	Receptor-interacting kinase-1

VII – ABREVIATURES

ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Standard error media
Ser	Serina
SMAC	Second mytocondria-derived activator of caspases
SNC	Sistema nerviós central
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STS	Estaurosporina
TAD	Transactivation domain
t-BID	Truncated Bid
Thr	Treonina
TM	Toxiques des microtubules
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF1	TNF-R associated factor 1
UV	Ultraviolat
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
v-MIA	Viral Mitochondria-localized Inhibitor of Apoptosis
WB	Western Blot
X/G	Xanthochymol/Guttiférone

VIII – AGRAÏMENTS

Aquesta tesi s'ha dut a terme al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida (UdL), en el si del Laboratori de Farmacologia Molecular, sota la direcció del Dr. Boix. Així mateix s'ha realitzat una estada de nou mesos a la "Station Biologique de Roscoff", en el grup de PCCR, sota la tutela del Dr. Meijer. Aquesta estada s'ha dut a terme en el marc del programa d'obtenció del Doctorat europeu. El finançament dels primers quatre anys de beca ha correspost a càrrec del "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació" de la Generalitat de Catalunya. Posteriorment he gaudit d'una beca de la Fundació Pifarré. Després d'aquesta breu introducció passo a agrair els qui d'una manera o una altra heu contribuït en aquesta tesi.

Enceto aquest apartat donant gràcies al meu director de tesi Jacint Boix. A ell li he d'agrair en primer lloc que em donés l'oportunitat de provar-me a mi mateixa què és la recerca a més a més de les moltes estones de discussió i enriquiment personal què suposen treballar amb ell. També vull agrair-li la paciència què sempre ha tingut davant les meues "maleses P21-activated kinase 2 Parc", el recolzament moral i psicològic què ha suposat i, naturalment, les bones estones de relax al cine i provant plats exòtics i picants als restaurants orientals. En segon lloc vull agrair molt especialment al Víctor José Yuste tot el recolzament he m'ha està arribant primerament des de l'altre costat dels Pirineus i més tard a només unes hores en TGV de Roscoff. Aquestes dues persones van marcar el meu primer referent de treball en un laboratori i han estat escoltant-me i esperonant-me en els moments més crítics. La discussió amb ells ha marcat els millors moments de lucidesa intel·lectual què he tingut durant aquests anys. No puc oblidar-me d'agrair els bons moments passats a les persones que han vingut a realitzar col·laboracions en el grup de Farmacologia Molecular, és a dir, a la Silvia, l'Àlex i la Judit. Us desitjo a tots tres molta sort. D'igual manera, vull agrair a la Xènia, el meu relleu a la cursa dels inhibidors de CDKs, tots els moments de gentilesa i paciència què m'ofereix cada dia, així com també l'ajuda en la redacció d'aquesta tesi. He d'agrair també al Joan X. Comella el haver-nos ofert el lliure accés a molts reactius així com el haver estat sempre disposat a la discussió enriquidora. Vull destacar també la gentilesa de tots els components del grup de Neurobiologia molecular. Vull agrair especialment a la Carme Solé tota la comprensió i interès que ha mostrat sempre per la meua feina, així com totes aquelles transfeccions que tant costen de fer i que jo he obtingut gràcies a ella. Gràcies de tot cor. Vull mostrar el meu agraïment al grup de Neurobiologia cel·lular en general i especialment a la bona disponibilitat per comentar qualsevol dubte científic que ens ha mostrat el Josep Esquerda. Agraeixo especialment a la Cèlia Casas el suport científic i logístic que ens ha brindat durant aquests anys. Vull mostrar el meu agraïment a una ex-combatent, la Maite Serrando, que a part de ser una marassa em va ensenyar moltes coses de dins i encara més de les de fora. Des d'aquestes pàgines vull agrair Xavi Gómez i la Elisabeth Talavera per les bones estones davant del citòmetre. Els meus agraïments també van dirigits als becaris, alguns que han marxat per passar a millor vida i d'altres que encara continuen esbarallant-se amb les tesis, especialment a la Eva

Piulats (o "Piulis), a la Micaela Molina i a la Gema Nieto. Gràcies a aquestes dues per ser sempre al meu costat per esperonar-me però també gràcies per simplement existir i ser com sou, sense vosaltres no hagués pogut resistir les bombes. Gràcies per compartir les tardes de bogeria, les escapades a Madrid i tot el que ha fet falta. Gràcies per acollir-me a casa vostra cada dia que quedar-me una estona més al laboratori suposava un assassinat. Gràcies Yu Hui i Hong Yin per ensenyar-me a respectar una cultura diferent de la meua. Vull agrair al personal administratiu, al PAS, als empleats de neteja, i especialment a la Mari i la Mila, les bones i escasses estones de xarrera que hem tingut durant aquests anys. També vull expressar el meu agraïment al personal de seguretat, per obrir-nos tantes vegades la porta durant els caps de setmana intensius. D'altra banda, agraeixo de tot cor als meus amics de sempre que m'heu esperonat quan em feia falta. He d'agrair a la Marian i a la Sònia que hagin estat sempre disposades a escoltar-me, recolzar-me i sobretot que hagin estat capaces de reconstruir el meu estat d'ànim en funció dels meus silencis. Gràcies Sònia per ajudar-me en la redacció de la tesi. També m'agradaria agrair a persones com l'Eduard, la Raquel, el Rubi, la Maria, el Julià, la Cèlia i al petit Arnau que durant aquests anys de tesi hagin sabut trobat l'ocasió de fer-me visites al laboratori quan el veure's depenia de l'estat dels experiments. Moltes gràcies a la meua família per haver entès que els caps de setmana no estaven fora del meu horari laboral. Vull agrair molt especialment a la meua més fervent fan, la padrina, l'atenció amb la que sempre m'ha escoltat i la paciència què ha tingut amb mi. Moltes, moltíssimes gràcies al meu *counterpart* de guerres i batalles per l'edició d'aquesta tesi, l'Ivi. Si no fos per tu i el teu arsenal de solucions per gairebé tot, aquesta tesi no hagués estat possible. Moltes gràcies també a tota aquella gent que també heu contribuït en aquesta tesi i que no hauré mencionat.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Laurent Meijer pour m'avoir offert si gentiment l'opportunité de joindre son équipe. Merci à l'ensemble de l'équipe de PCCR : Marc Blondel, Stéphane Bach, Nathalie Desban, Nathalie Carmoi, Blandine Baratte, Jens Reinhart, Sophie Bamps, Déborah Tribouillard, Damien Guiffan et Laurence Bach . Des gros mercis à mes collègues de l'UPS : Oliviero Lozach, Yoan Ferandin et Sophie Schmitt. Je tiens à remercier Laurence pour le bon accueil à niveau humain et aussi administratif qui m'a beaucoup facilité l'arrivée à Roscoff. De la même façon je veux exprimer ma reconnaissance à Jens et Sophie pour sa gentillesse et pour être toujours prêts à partager les idées avec enthousiasme. Merci Sophie pour les petits déjeuners et dîners à deux, même avec les silences du matin, qui m'ont fait oublier la solitude. Merci, merci, merci Sophie. Je veux remercier spécialement Yoan Ferandin pour son amitié et le support moral. Je tiens à remercier à Stéphane Egée sa gentillesse et sa sincérité. Des mercis aussi à Stéphane Hurdès pour mon début avec le Body Board et son excellent sushi, Christophe Six qui malgré être très taquin est un type super et Laurence Garczarek pour tout simplement sa compagnie. Merci à Susana Coelho pour sa gentillesse lors de l'utilisation du lecteur à fluorescence. Je tiens également à remercier Serge Poulet pour ses gentilles offres logistiques. Des gros

mercis à Francisco et Monica pour m'avoir empêchée de crever. Mes remerciements au personnel administratif et logistique de la Station, ils ont été supers. Des grands mercis à Olivier Collin et Jean Pennors pour leur inestimable aide.