

Tesi Doctoral

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL
DNA EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA A
*Saccharomyces cerevisiae***

Marta Rojas Amadó



Barcelona, Setembre 2007

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
Programa de Doctorat de Biomedicina
Bienni 2002-2004

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL DNA EN L'EXPRESSION
GÈNICA A *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria presentada per **Marta Rojas Amadó**
Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

**Tesis Doctoral realitzada en el Departament de Biologia
Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona
(IBMB-CSIC)**

Directors

José Portugal Minguela

Benjamin Piña Capó

Tutor

Rafael Franco Fernández

Agraïments

En un moment així, miro enrera i no se per on començar. Hi ha tanta gent que ha estat important per mi durant aquests anys, que primer de tot voldria agrair a tothom que ha contribuït directament o indirecta a fer possible aquesta tesi.

Una esmena especial és pels jefes, tant pel Josep Portugal com pel Benjamí Piña, codirectors d'aquesta tesi. Gràcies per haver-me acollit als respectius laboratoris, per haver-me donat l'oportunitat de conèixer de més aprop el món de la ciència i, d'ajudar-me a tirar endavant aquest projecte de tesi. Al Josep li vull agrair la dedicació i l'esforç per tal d'endinsar-me en el món més químic, la seva paciència i els seus consells, i... els M&M's (dificils d'oblidar..). Tan bon punt aterridada a la cinquena planta, el Benjamí em va brindar l'oportunitat de treballar "in silico". Havia sigut el meu desitg durant els darrers anys de la carrera, de fet, el primer cop que vaig veure els espots d'un microarray em vaig emocionar... Moltes gràcies per donar-me aquesta oportunitat.

Gràcies al Joaquim Ariño, a l'Anna Barceló i a la Laia Viladevall del "Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleis" de la UAB. Tanmateix, al Jesús García Cantalejo de la "Unidad de Genómica" de la UCM. I a la Lidia Sevilla de la "Unitat de Transcriptòmica" del PCB.

Vull agrair a la gent del laboratori. De quin laboratori?

Bé començaré per l'inici: Lab. 514, Moltíssimes gràcies a tots ells. Sobretot a la Sylvia! Moltíssimes gràcies per ajudar-me, ensenyar-me i recolzar-me, en tot moment. Gràcies per estar fins a quarts de 9 d'un divendres esperant que s'assequés el pellet. Al Xavi Dorito, a la Lorena, al Marc i a la Dori, per fer un dia a dia (i algun vespre) més amè i divertit. Gràcies al Ferran Azorín pel suport i del PBA3B: a l'Olga, a la Sara per compartir hores intempestives, i a tota la resta. Així com a la Flora i als originals del grup de mosques.

Tot i que els laboratoris estiguessin separats per la diagonal, els podia arribar a trepitjar cada un fins a dues vegades al dia. Així que el laboratori del CID ha sigut com la meva segona casa. I doncs, què puc dir de les nòies tan maques de l'actual 520? La Laia, aiiii quantes coses!! moltes gràcies per tot, tot vol dir...tots els moments que hem compartit, les xerrades (alguna de ciència també hem tingut, oi?), sopars, cafès, anades i vingudes amb la moto...A la Sue li vull agrair la paciència, les converses i reflexions dels capvespres. Sense tu hagués sigut molt més dur, do you know?. A la Tània per estar sempre disposada a escoltar i donar un cop de mà. I clar, al nostre home del labo!! El gran i estupendísimo Sergio!!! (le invadí su poiata i no pasó nada...!!, es más majo..), si és que és un crack! I a l'Alba, el Sergi i l'Anna per ser uns molt bons companys de laboratori, cafès, dinars... Si el 520 és el laboratori actual, no m'oblidaré mai de l'antic, amb el David i la Natàlia, ara ja no hi són, però especialment el David, ha sigut unes de les persones de les que he après més durant els primers anys, el ventall d'informació va des del llevat, el Southern, fins a les lletres del Sabina. Però sobretot li vull agrair el seu companyerisme i el seu bon humor. Te veré en el tribunal?taxín-taxín..

Un dels laboratoris, a més de ser el Servei de Genòmica, a vegades també funciona com a "confessionario". A la responsable que li vull agrair no molt.. sinó moltíssim. A la Marta Casado. Ho repetiré: Moltes gràcies!! ja que sense ella, tinc els

meus dubtes que aquesta tesi hagués arribat a bon port. Han sigut molts consells, favors, minireunions amb el jefe i alguna bronca també..., per tot això i més, li dono les gràcies de tot cor.

Enfront el nostre laboratori hi ha el de les superRNA girls (o... o no? pobres l'únic grup una mica associat a l'RNA, i han sofert molt!). La Maria, que una mica més i em pela en el bar de la L.E., però jejeje, va estar molt bé!!, crec que a partir de llavors ens vem conèixer una mica i més, i me'n alegro moltíssim, molts petonets i moltes gràcies per tot! Les companyes de la Maria són la Marlen i la Mariette, jejeje Mariette for president!! i tant que la votaré!.

Més enllà, hi ha el Roca's lab. Un laboratori a envejar! net, pulit i endreçat! Amb en Joaquim al qual li vull agrair, tant l'ajut aportat durant la tesi com en el darrer tram. El Nacho/ete un amic allí donde los haya... muchos besitos, bé, ja ens veurem als "estates", al nord-est, finalment? (sí, sí, porfi!). A la Belén, al Ricky i al Xavi gràcies per les bones estones.

A part de la gent dels laboratoris, hi ha una bona part d'amics que han estat des del començament, i sobretot en la darrera etapa, ajudant-me a tirar endavant, de fet, molts d'ells tenien tantes ganes com jo que això arribés al seu destí: El Siki, la Lola, la Raquel, l'Oriol i la Norma, la Coral, la Núria, la Nurieta i la Marga... Aiii! que macos són!

Tanmateix hi ha algú molt i molt important. Tot i estar molt lluny, el Pepe ha sigut la persona que l'he tinguda més aprop en aquest darrer any, una de les temporades més difícils que he passat. Gràcies per ajudar-me tan personalment com científicament.

La família ha sigut un pilar clau, sense ells de ben segur que aquest projecte no hagués ni començat. Així que aquesta tesi els hi dedico a ells, a ma mare, mon pare, a la iaia que ha encès més d'un ciri, i al meu avi que sempre ha confiat amb mi. I a la Gemma, sempre donant-me ànims. Prou que m'emociono...!!!

Als meus pares,
a la Gemma, i

al Pepe

Índex

ÍNDEX GENERAL	ii
ÍNDEX DE FIGURES	vii
ÍNDEX DE TAULES	x
ABREVIATURES	xii

ÍNDEX GENERAL

INTRODUCCIÓ

I.	UNIÓ AL DNA DE MOLÈCULES DE BAIX PES MOLECULAR	1
	I.1 Intercalants al DNA	3
	I.2 Unió a través dels solcs del DNA	5
II.	DOS FÀRMACS INTERCALANTS: DAUNORUBICINA I CRIPTOLEPINA	6
	II.1 Daunorubicina	6
	II.1.1 Mecanismes d'acció de la Daunorubicina	7
	II.1.2 Intercalació específica de la Daunorubicina en el DNA	8
	II.2 Criptolepina	9
	II.2.1 Mecanismes d'acció de la Criptolepina	10
	II.2.2 Intercalació específica de la Criptolepina en el DNA	11
III.	EL LLEVAT <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COM A EINA D'ESTUDI	12
	III.1 Efecte de la deleció gènica en la sensibilitat al fàrmac	14
	III.2 Resposta transcripcional al tractament amb el fàrmac	16
	III.3 Regulació de la transcripció	19
	III.3.1 Activació del metabolisme de la galactosa	19

RESULTATS

Capítol I. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA DELS INTERCALADORS

A.	ESTUDI DE TOXICITAT DELS INTERCALANTS EN SOQUES DE LLEVAT AMB DIFERENTS DOTACIONS GÈNIQUES	23
	A.1 Creixement en glucosa com a font de carboni	24
	A.1.1 Permeabilitat de les soques	24
	A.1.2 Mecanisme de reparació del dany al DNA	24
	A.2 Creixement en galactosa com a font de carboni	26
	A.2.1 Especificitat del fàrmac	26
	A.3 Determinació de la IC50	27
B.	ACUMLACIÓ INTRACEL·LULAR DE DAUNORUBICINA EN DIVERSES SOQUES	28
C.	EFFECTE DE LA DAUNORUBICINA I LA CRIPTOLEPINA EN LA REGULACIÓ DELS GENS DE LA FAMÍLIA <i>GAL</i>	30

Capítol II. ESTUDI DE LA RESPOSTA GLOBAL DEL LLEVAT ALS INTERCALANTS DAUNORUBICINA I CRIPTOLEPINA

<i>Primera Part. Estudi de la Resposta Global del Llevat a Tractaments Curts de Daunorubicina i Criptolepina</i>	33
A. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE CÈL·LULES TRACTADES AMB DAUNORUBICINA	34
A.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment depenents de Daunorubicina	34
B. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE CÈL·LULES TRACTADES AMB CRIPTOLEPINA	38
B.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment depenents de Criptolepina	39
C. QUANTIFICACIÓ I VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL	42
C.1 Quantificació de la variació de l'expressió gènica deguda al tractament amb Daunorubicina	42
C.1.1 Expressió diferencial i validació dels microarrays dels gens involucrats en diferents processos	43
C.1.2 Expressió diferencial i validació dels gens glicolítics i del <i>RPS28A</i>	45
C.2 Quantificació i validació de l'expressió gènica diferencial deguda al tractament amb Criptolepina	46
<i>Segona Part. Estudi de la Resposta Global del Llevat a Tractaments Prolongats de Daunorubicina i Criptolepina</i>	49
A. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL EN TRACTAMENTS PROLONGATS DE DAUNORUBICINA	50
A.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment depenents de la Daunorubicina	50
A.2 Perfils transcripcionals conservats entre tractaments llargs i curts	52
A.2.1 Metabolisme dels Aminoàcids	52
A.2.2 Metabolisme dels Carbohidrats	52
B. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL EN TRACTAMENTS PROLONGATS DE CRIPTOLEPINA	54
B.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment depenents de la Criptolepina	55
C. QUANTIFICACIÓ I VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL	57
C.1 Expressió gènica alterada per la Daunorubicina	57
C.1.1 Correlació dels valors dels microarrays i de la PCR a Temps Real	58
C.2 Expressió gènica alterada per la Criptolepina	59
C.2.1 Correlació de les dades dels microarrays i de la PCR a Temps Real	60

<i>Tercera Part. Anàlisi dels Efectes de la Daunorubicina</i>	62
A. EFECTES DE LA DAUNORUBICINA EN EL METABOLISME DELS CARBOHIDRATS EN TRACTAMENTS CURTS	62
A.1 Desacoblament al llarg de la cinètica dels gens ribosomals i els del metabolisme dels carbohidrats	62
A.2 Inhibició del metabolisme dels carbohidrats per la Daunorubicina	67
A.3 Reguló dels gens glicolítics	70
A.4 Quantificació de l'expressió diferencial de gens glicolítics	73
B. EFECTE DE LA DAUNORUBICINA EN LA REGULACIÓ MEDIADA PER Gen4p	74
B.1 Anàlisi fenotípic de l'acció de la Daunorubicina en el metabolisme dels aminoàcids	74
 Capítol III. MECANISMES D'ACCIÓ DE LA DAUNORUBICINA I LA CRIPTOLEPINA	
A. INTERPRETACIÓ DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL MITJANÇANT ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ	77
A.1 Mecanismes d'acció de la Daunorubicina	77
A.2 Mecanismes d'acció de la Criptolepina	82
A.3 Factors de transcripció presents en les dues respostes transcripcionals	83
DISCUSSIÓ	85
▪ Efecte de la integritat de la membrana plasmàtica en la citotoxicitat de la Daunorubicina i la Criptolepina	86
▪ Efecte inhibitori de la Daunorubicina en el metabolisme de la galactosa	87
▪ Alteració del transcriptoma del llevat en resposta a la Daunorubicina i la Criptolepina	89
▪ Avantatges de les diferents plataformes d'anàlisi global de la resposta transcripcional	90
▪ Resposta global a la Daunorubicina i la Criptolepina: Efecte del temps i la concentració de tractament	91
▪ Les respostes induïdes són específiques per a cadascun dels intercalants	93
▪ L'activitat antiproliferativa de la Criptolepina està governada per la resposta a estrès influenciada pel dany al DNA	93
▪ L'activitat antiproliferativa de la Daunorubicina depèn de la interferència amb la regulació de l'expressió gènica	95

▪ Desregulació del metabolisme dels carbohidrats provocada per la Daunorubicina. Inhibició de l'expressió dels gens glicolítics	97
CONCLUSIONS	101
MATERIAL I MÈTODES	
I. PREPARACIÓ DELS FÀRMACS	103
I.1 Preparació i determinació de la concentració de Daunorubicina	103
II. TÈCNiques DE TREBALL AMB EL LLEVAT <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
II.1 Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades en aquest treball	104
II.2 Creixement i manteniment de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
II.2.1 Composició dels medis utilitzats per créixer llevats	104
II.2.2 Creixement i manteniment rutinari de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
II.2.3 Anàlisi de creixement en medi líquid de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
III. MESURA DE L'ACUMULACIÓ INTRACEL·LULAR DE LA DAUNORUBICINA	108
IV. MÈTODES DE MANIPULACIÓ I EXTRACCIÓ DEL DNA	109
IV.1 Obtenció de DNA plasmídic	109
IV.1.1 Transformació en bacteris	109
IV.1.2 Minicultius i glicerinars	110
IV.1.3 Obtenció de plasmidi a petita escala (Minipreparacions)	110
IV.1.4 Transformació del DNA plasmídic en llevats	111
IV.1.5 DNA plasmídic utilitzat	112
IV.1.6 Soca bacteriana utilitzades per a la preparació de DNA plasmídic	112
V. MÈTODES MANIPULACIÓ I EXTRACCIÓ DEL RNA TOTAL	112
V.1 Extracció RNA total de llevat	112
V.1.1 Mètode extracció RNA del fenol calent	113
V.1.2 Tractament amb DNasa I	114
V.1.3 Extracció RNA total amb el <i>Kit RiboPure™ Yeast</i> (Ambion)	115
V.1.4 Tractament amb DNasa I amb el <i>Kit RiboPure™ Yeast</i> (Ambion)	116
VI. ANÀLISI QUANTITATIU I QUALITATIU DELS ÀCIDS NUCLEICS	117
VI.1 Determinació de la puresa i la concentració dels àcids nucleics	117
VI.2 Electroforesis en gel de agarosa	118
VI.2.1 Gels d'agarosa per l'anàlisi del DNA	118
VI.2.2 Gels d'agarosa per l'anàlisi de l'RNA	118

VII. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA	120
VII.1 RT-PCR semiquantitativa	121
VII.2 PCR quantitativa a Temps Real	122
VII.3 Encebadors per les PCRs	124
VII.3.1 Encebadors usats	125
VIII. MICROARRAYS	126
VIII.1 Disseny experimental	127
VIII.1.1 Disseny experimental per microarrays de cDNA	128
VIII.1.2 Disseny experimental per microarrays d'oligonucleòtids	129
VIII.2 Síntesi del cDNA i marcatge de les mostres	130
VIII.2.1 Marcatge directe	132
VIII.2.2 Marcatge indirecte	133
VIII.3 Hibridació	133
VIII.3.1 Hibridació amb l'equip ArrayBooster	134
VIII.3.2 Hibridació amb l'equip Lucidea SlidePro System	135
VIII.4 Detecció de la hibridació	136
VIII.5 Transformació de les dades obtingudes	136
VIII.6 Criteris de selecció	137
VIII.7 Anàlisi amb els gens expressats diferencialment	138
VIII.7.1 Anàlisi de les categories ontològiques	138
VIII.7.2 Anàlisi de la regulació transcripcional	138
BIBLIOGRAFIA	141

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura I1	Mecanismes d'inhibició de la síntesi d'àcids nucleics per antibiòtics i fàrmacs.	2
Figura I2	Principals mètodes d'intercalació.	4
Figura I3	Estructura del complex Daunorubicina-DNA.	5
Figura I4	Estructura del complex Criptolepina-DNA.	6
Figura I5	Estructura química de la Daunorubicina.	9
Figura I6	Estructura del complex format per la unió de dues molècules de Daunorubicina en l'hexàmer d(CCTACG) segons resultats de les tècniques cristal·logràfiques.	9
Figura I7	Estructura química de l'alcaloide Criptolepina.	11
Figura I8	Representació gràfica de la tècnica dels microarrays de DNA per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	18
Figura I9	Vies de regulació dels gens <i>GAL</i> .	20

RESULTATS

Figura R1	Efecte citotòxic de la Daunorubicina i la Criptolepina en diverses soques.	25
Figura R2	Efecte citotòxic de la Daunorubicina i la Criptolepina en diverses soques en medi amb galactosa com a font de carboni.	27
Figura R3	Acumulació intracel·lular de la Daunorubicina en diverses soques de llevat.	29
Figura R4	Efectes de la Daunorubicina en l'expressió dels gens del metabolisme de la galactosa.	31
Figura R5	Creixement dels cultius analitzats en l'estudi dels canvis transcripcionals per l'acció de la Daunorubicina i de la Criptolepina.	33
Figura R6	Agrupació dels valors d'expressió gènica en el llevat després del tractament amb 12µM Daunorubicina.	36
Figura R7	Classificació dels gens induïts i reprimits en presència de 12µM Daunorubicina durant 1 o 4 hores.	36
Figura R8	Agrupació dels valors d'expressió gènica en el llevat després del tractament amb 17µM Criptolepina.	40
Figura R9	Resultats de l'expressió gènica obtinguts per RTPCR quantitativa entre cultius tractats i no tractats amb Daunorubicina.	43
Figura R10	Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids.	44
Figura R11	Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids.	46
Figura R12	Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids.	47

Figura R13	Correlació de l'expressió gènica obtinguda per PCR a temps real, respecte els valors dels microarrays d'oligonucleòtids de cèl·lules tractades amb Criptolepina respecte les no tractades.	48
Figura R14	Creixement dels cultius analitzats en l'estudi dels canvis transcripcionals per l'acció de la Daunorubicina i de la Criptolepina.	49
Figura R15	Perfils transcripcionals dels gens reprimits a llarg termini en l'experiment de 0, 1 i 4 hores de tractament amb Daunorubicina.	53
Figura R16	Agrupació dels valors d'expressió diferencial dels gens implicats en el metabolisme dels carbohidrats, descrits pel GO (SGD), com a resposta a tractaments llargs de Daunorubicina.	54
Figura R17	Classificació dels gens induïts i reprimits pel tractament amb 7.5µM o 17µM Criptolepina.	55
Figura R18	Anàlisi diferencial de la transcripció dels gens en cèl·lules tractades amb 5µM o 12 µM de Daunorubicina mitjançant PCR a temps Real.	58
Figura R19	Correlació de l'expressió gènica obtinguda per PCR a Temps Real, respecte els valors dels microarrays de cDNA de cèl·lules tractades amb Daunorubicina.	59
Figura R20	Anàlisi diferencial de la transcripció dels gens en cèl·lules tractades amb 7.5µM o 17 µM de Criptolepina mitjançant PCR a temps Real.	60
Figura R21	Correlació de l'expressió gènica obtinguda per PCR a temps real respecte els valors dels microarrays de cDNA de cèl·lules tractades amb Criptolepina.	61
Figura R22	Rectes de regressió de la resposta transcripcional al tractament amb Daunorubicina.	63
Figura R23	Vies principals del metabolisme dels carbohidrats.	65
Figura R24	Agrupació al llarg del temps dels canvis d'expressió dels gens de les subunitats ribosomals i els del metabolisme dels carbohidrats, provocats per la Daunorubicina.	66
Figura R25	<i>Hierarchical clustering</i> de l'expressió diferencial dels gens relacionats en les principals vies del metabolisme dels carbohidrats descrits pel <i>GO-Term (SGD)</i> , com a resposta al tractament amb Daunorubicina.	67
Figura R26	Efecte inhibitori de la Daunorubicina en la via metabòlica de la fermentació de glucosa en el llevat.	69
Figura R27	Efecte de la Daunorubicina en el Cicle de Krebs.	70
Figura R28	<i>Hierarchical Clustering</i> de tots els gens regulats per Gcr2p que presenten una expressió diferencial al tractament amb Daunorubicina.	72
Figura R29	Classificació dels gens regulats per Gcr2p i/o implicats en el metabolisme dels carbohidrats amb valors d'expressió diferencial en l'anàlisi global al tractament amb 12µM Daunorubicina.	73
Figura R30	Efecte de la Daunorubicina en els nivells transcripcionals dels gens glicolítics i l' <i>RPS28A</i> .	74
Figura R31	Efecte de la Daunorubicina en la taxa de proliferació en un fons Gcn4p activat.	76
Figura R32	Factors de transcripció enriquits entre els gens reprimits per la Daunorubicina.	81

Figura R33	Factors de transcripció comuns entre els gens alterats per la Daunorubicina i la Criptolepina.	84
------------	--	----

MATERIAL I MÈTODES

Figura M1	Disseny experimental.	127
Figura M2	Representació gràfica del marcatge amb els fluorocroms Cy3 i Cy5 i el model d'hibridació pels microarrays de cDNA.	128
Figura M3	Representació gràfica del marcatge amb els fluorocroms Cy3 i Cy5, i el model d'hibridació pels microarrays d'oligonucleòtids.	128
Figura M4	Esquema dels processos a seguir pel marcatge directe i per l'indirecte.	130
Figura M5	Fórmula de la distribució hipergeomètrica.	138

ÍNDEX DE TAULES

RESULTATS

Taula R1	Valors de les concentracions de Daunorubicina i Criptolepina que inhibeixen el creixement cel·lular un 50% (IC50).	28
Taula R2	Quantitat de gens obtinguts en l'experiment de la resposta global a la Daunorubicina.	34
Taula R3	Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa superior a un factor d'1.7, en cèl·lules tractades amb 12µM Daunorubicina.	37
Taula R4	Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a la meitat al tractar les cèl·lules amb 12µM Daunorubicina.	38
Taula R5	Quantitat de gens obtinguts en l'experiment de la resposta global a la Criptolepina.	39
Taula R6	Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa superior a una vegada i mitja (un factor d'1.5), en cèl·lules tractades amb 17µM Criptolepina.	41
Taula R7	Principals ontologies dels gens amb una repressió relativa a una vegada i mitja, en cèl·lules tractades amb 17µM Criptolepina.	41
Taula R8	Quantitat de gens activats i reprimits com a resposta al tractament amb 5µM i 12µM de Daunorubicina.	50
Taula R9	Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a 0.35 ($\text{Log}_2 < -1.5$) en cèl·lules tractades amb 5 i 12µM Daunorubicina.	51
Taula R10	Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a 0.5 ($\text{Log}_2 < -1$), en cèl·lules tractades amb 5 i 12µM Daunorubicina.	52
Taula R11	Quantitat de gens activats i reprimits com a resposta al tractament amb 7.5µM i 17µM de Criptolepina.	55
Taula R12	Principal ontologia pels gens amb una expressió relativa superior a 2.8 ($\text{Log}_2 > 1.5$), en cèl·lules tractades amb 7.5 i 17µM Criptolepina.	56
Taula R13	Principals ontologies pels gens amb una expressió relativa inferior a 0.35 ($\text{Log}_2 < -1.5$), en cèl·lules tractades amb 7.5 i 17µM Criptolepina.	57
Taula R14	Llistat dels gens de les principals vies del metabolisme dels carbohidrats.	68
Taula R15	Dades utilitzades en el identificar els factors de transcripció més enriquits entre els gens modulats per la Daunorubicina segons el tractament.	78
Taula R16	Factors de transcripció majoritaris que regulen els gens alterats per la Daunorubicina a curt termini (1 i 4 hores) o a llarg termini (10-15 hores).	79
Taula R17.	.Agrupació del gens inhibits per la Daunorubicina i regulats per Sok2p, Gcn4p, Gcr1p o Gcr2p, segons el procés.	79
Taula R18	Dades utilitzades en el identificar els factors de transcripció més enriquits entre els gens modulats per la Criptolepina segons el tractament.	82

Taula R19	Factors de transcripció majoritaris que regulen els gens alterats per la Criptolepina a curt termini (1 i 4 hores) o a llarg termini (15-20 hores).	83
-----------	---	----

MATERIAL I MÈTODES

Taula M1	Llistat de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades.	104
Taula M2	DNA plasmídic usat en aquest estudi.	112
Taula M3	Soca d' <i>E.coli</i> usada en aquest estudi.	112
Taula M4	Llistat del encebadors usats en aquest estudi.	125

ABREVIATURES*

AA-dUTP	Aminoallyl -dUTP
Abs	Absorvència
CSM	<i>Complete Synthetic Medium</i>
Ct	<i>Cycle treshold</i>
dCTP	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
DEPC	Dietilpirocarbonat
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
ESR	<i>Environmental Stress Response</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
mAMSA	<i>Amsacrine</i>
MMLV	<i>Mouse Moloney Leukemia Virus</i>
MMS	Metil metano-sulfonat
MOPS	<i>Morpholino</i>
OD	<i>Optical Density</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PDR	<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>
PEG	<i>Polietilenglicol</i>
PMT	<i>Photomultiplier</i>
SD	<i>Synthetic defined</i>
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
TE	Tris-EDTA
Ty	<i>Transposon yeast</i>
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
3-AT	3-aminotriazol

* Només es precisen les abreviatures no estàndards (segons Biochemical Journal).

Introducció

I. UNIÓ AL DNA DE MOLÈCULES DE BAIX PES MOLECULAR

El càncer és el resultat d'un combinat de diversos tipus de malalties, les quals poden diferir àmpliament en les causes i en la biologia. El tret en comú en els càncers coneguts és l'adquisició d'anomalies en el material genètic de les cèl·lules cancerígenes i en la progènie. Al llarg de les darreres dècades, s'han bolcat molts esforços en entendre els processos genètics que desencadenen la tumorigènesis. La informació obtinguda ha servit de gran ajuda per al desenvolupament de tractaments efectius i específics en contra d'aquesta malaltia genètica.

Una de les majors preocupacions, és l'efecte invers que poden desencadenar els fàrmacs usats per al tractament, ja que donades les circumstàncies apropiades, aquests fàrmacs per si mateixos són capaços de produir cèl·lules tumorals, degut a les condicions emprades en l'ús rutinari dels antitumorals en clínica. L'interès suscitat de la bioquímica i la biologia molecular pels fàrmacs antitumorals és provocat per l'acció preferentment inhibidora de la síntesi dels àcids nucleics per part d'aquestes molècules (Fig. II). De fet, molts d'aquests fàrmacs interaccionen físicament amb el DNA, distorsionant la seva estructura i la funcionalitat (Waring, 1981).

La molècula d'àcid nucleic té la capacitat d'interaccionar amb un rang ampli de substrats químics, els quals inclou l'aigua, ions metàl·lics o en complexes, molècules orgàniques petites i proteïnes. L'efectivitat d'una molècula per a antitumoral depèn de l'especificitat i dels mecanismes que indueixen la mort cel·lular. És a dir, l'espectre de l'activitat biològica d'una molècula, parcialment depèn del grau d'especificitat de la seqüència i de l'afinitat al DNA, del nombre i la localització cel·lular en el genoma, i de la resposta cel·lular a la interacció. Per tant, les molècules que puguin unir-se a una seqüència específica del DNA, provocar efectes citotòxics reduïts i tenir una elevada especificitat, seran molècules de gran interès terapèutic.

En alguns casos, la interacció lligand-DNA dóna lloc a una important distorsió estructural del DNA, acompanyada en alguns casos de la inducció de lesions al DNA, induint la reparació i l'apoptosi. Dificultant processos cel·lulars com la replicació o la transcripció, per exemple bloquejant el moviment de les helicases, topoisomereses i polimerases. Un altre mecanisme potencial d'acció és la unió selectiva a seqüències llargues repetides, i provocar aberracions cromosòmiques (translocacions, delecions i amplificacions) entre altres canvis estructurals de la cromatina. Aquestes regions podrien ser essencials pel correcte funcionament dels cromosomes, consegüentment es

desencadenaria un efecte global cel·lular (Nelson et al., 2004). En altres casos, la lesió podria interferir en processos nuclears específics, tals com la regulació transcripcional (expressió/repressió) de gens específics (Gniazdowski et al., 2005).

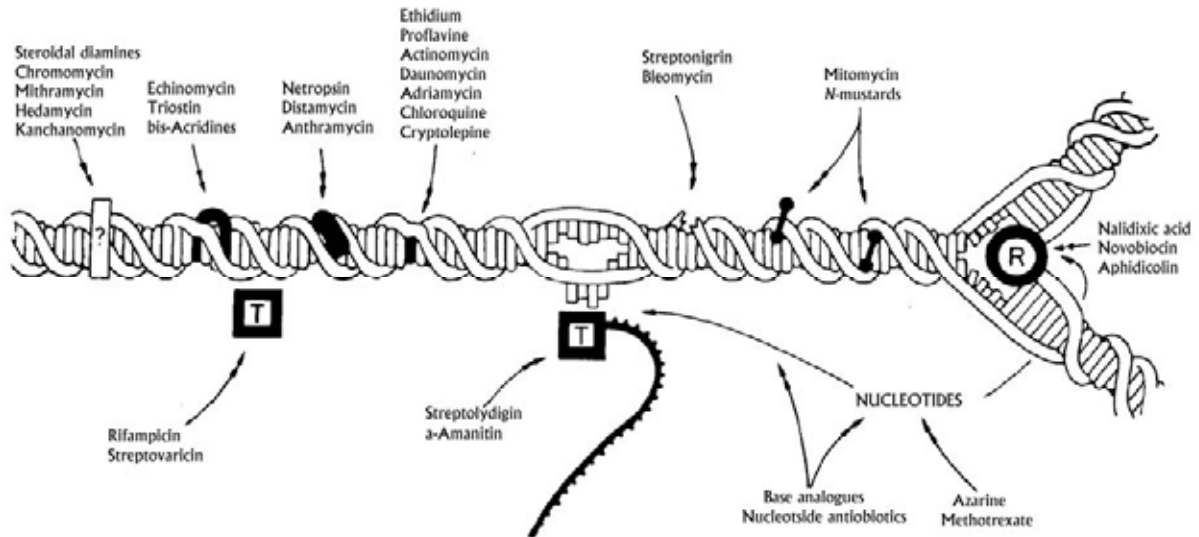


Fig. 11. Mecanismes d'inhibició de la síntesi d'àcids nucleics per antibiòtics i fàrmacs. R representa el complex enzimàtic encarregat de la replicació, T la RNA polimerasa. Figura modificada (Waring, 1981).

Cap als anys seixanta, a partir d'anàlisis d'aminoacridines, molècules amb cations aromàtics planars, que interaccionaven amb el DNA va aparèixer per primer cop el terme intercalant, un tipus d'unió no-covalent (Lerman, 1961). Fins aquell moment, els fàrmacs antitumorals més coneguts i més utilitzats en clínica com agents terapèutics eren els agents alquilants. Aquests compostos, tals com *sulfur mustards* o nitrosoureas entre d'altres, formen ponts covalents amb centres nucleofílics del material biològic, especialment proteïnes i àcids nucleics. Les molècules amb una unió no-covalent, interaccionen amb el DNA mitjançant un dels 3 mecanismes següents; intercalar l'anell aromàtic planar entre parells de bases, mecanisme reversible; unir-se al solc menor o major del DNA (*minor/major-groove binding*); unir-se al llarg de l'hèlix externament, a través d'interaccions electrostàtiques (*outside binding*). Molts dels compostos combinen diferents mecanismes d'unió, per exemple, intercalació i unió al solc menor (Priebe et al., 2001; Waring, 1981).

- **Intercalants.** Posicionament total o parcial de la molècula generalment plana enmig d'un parell de bases del DNA, perpendicularment a l'eix de l'hèlix del DNA. Les interaccions amb les bases nitrogenades són de tipus electrostàtic o de van der Waals i en ocasions mitjançant la formació de ponts d'hidrogen. Els intercaladors s'uneixen a la doble cadena de DNA de manera reversible.
- **Unió al solc de l'àcid nucleic.** La disposició en doble hèlix de les cadenes de DNA forma uns solcs a l'exterior de l'hèlix on resideixen els grups fosfat dels nucleòtids, segons l'amplitud dels solcs es classifiquen en menor i major (*minor/major-groove binding*). Les proteïnes reguladores s'uneixen preferentment, al solc major, a diferència de les agents de baix pes molecular que s'uneixen en el solc menor.
- **Interaccions electrostàtiques externes.** Generalment es produeixen per ions que reconeixen la forma del DNA i l'atmosfera iònica generada pels fosfats. És una unió poc específica ja que l'ió té tendència a estar deslocalitzat al voltant de l'àcid nucleic.

A continuació, es descriuen en més detall els mecanismes d'unió al DNA més rellevants dins d'aquest treball.

I.1 Intercalants al DNA

Els compostos intercaladors s'introdueixen entre dos parells de bases del DNA estabilitzant-se principalment per apilament o *stacking* (Fig. I2). L'estructura dels intercaladors està composta sempre per anells aromàtics, generalment amb un mínim de 3 cicles. D'aquests anells poden sortir grups laterals capaços de posicionar-se al llarg del solc menor, fet que aporta estabilitat al compost (Chaires, 1998). És habitual que aquests compostos presentin grups carregats positivament en l'anell o en els substituents, ja que interaccionen amb un polinió com és el DNA. El mecanisme d'entrada i posicionament del compost entre el parell de bases distorsionant l'estructura del DNA, no està ben definit, però es suggereix l'aprofitament del fenomen d'obertura o *breathing* de la doble hèlix de DNA.

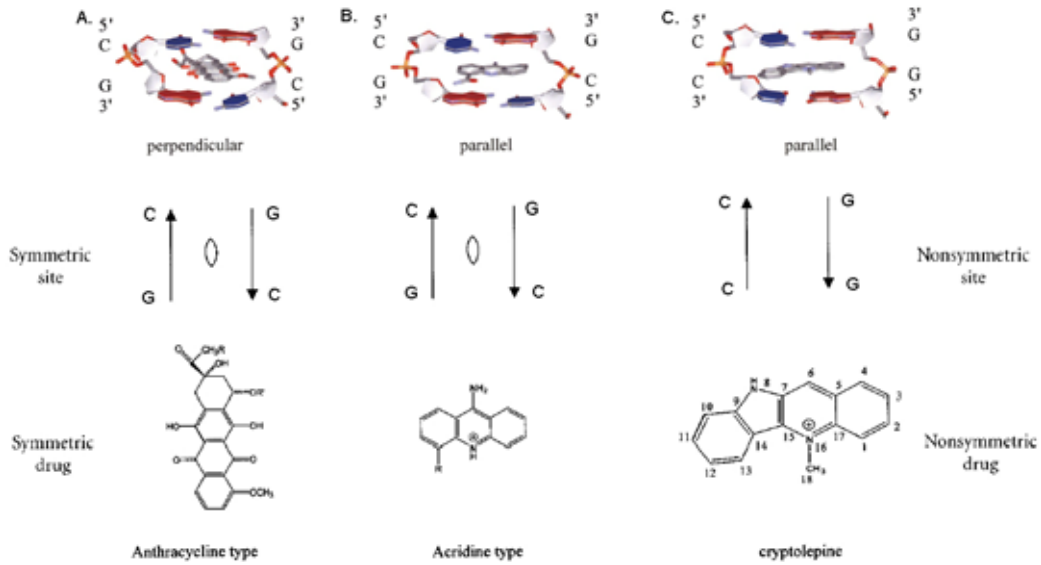


Fig. 12. Principals mètodes d'intercalació. A. Antraciclina, grup al que pertany la Daunorubicina, B. Acridina, grup on pertany el bromur d'etidi i C. Criptolepina. Figura modificada (Lisgarten et al., 2002a).

Els intercaladors distorsionen l'estructura del DNA, podent fer-li perdre la seva funcionalitat. Habitualment, els efectes macroscòpics més rellevants són un increment en la longitud de les cadenes del DNA i el desenroscament o *unwinding* de la doble cadena, com a conseqüència de la variació del gir en el punt d'intercalació (Waring, 1981).

Els fàrmacs intercaladors generalment tenen preferència per zones de citosina-guanina (o guanina-citosina) enfront les d'adenina-timina (o timina-adenina). A més, tenen preferència per 5'-CG-3' que per 5'-GC-3'. Les raons fisicoquímiques per aquesta preferència no estan clares. Els substituents del cromòfor intercalador poden reconèixer bases al llarg del solc menor i aportar especificitat al conjunt de la molècula per seqüències més llargues que el parell de bases del lloc d'intercalació (Fig. 13).

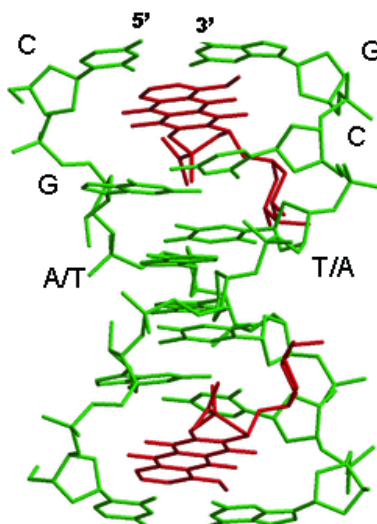


Fig. I3. Estructura del complex Daunorubicina-DNA. Estructura cristal·logràfica d'un intercalador, la Daunorubicina (vermell) entre el pas CpG, l'amino-sucres anomenat daunosamina, es posiciona cap a les bases A o T.

I.2 Unió a través dels solcs del DNA

La gran majoria de les molècules intercaladores al DNA s'uneixen a través del solc menor. Els fàrmacs antitumorals (Fig. I4), generalment entren pel solc menor aprofitant el potencial negatiu que es troba en aquesta regió, en canvi, la gran majoria de les proteïnes ho fan a través del solc major (Waring, 1981).

La interacció fàrmac-DNA pel solc menor ve determinada per un terme entàlpic derivat bàsicament d'interaccions electrostàtiques fortes entre el fàrmac (generalment un catió) i els grups fosfat, interaccions de van der Waals, i per ponts d'hidrogen entre el compost i els grups de les bases orientats cap al solc estret. Paral·lelament, existeix un terme entròpic molt important, relacionat bàsicament amb el desplaçament de l'esquelet d'hidratació (Berman and Young, 1981; Chaires, 2006). Altres propietats dels *minor-groove binders* és la forma allargada i corbada, la presència de grups carregats positivament, anells aromàtics (normalment coplanaris) i abundants grups polars (potencials formadors de ponts d'hidrogen amb les bases) (Waring, 1981). La majoria d'aquest compostos tenen preferència per la unió entre A-T més que per la G-C (Neidle, 2001; Wemmer and Dervan, 1997).

Una propietat dels *minor-groove binders* és la menor distorsió del DNA respecte els intercaladors, característica associada a una menor interferència en l'activitat dels mecanismes cel·lulars (Zacharias, 2006), tanmateix és un tret que resulta en discussió (Nelson et al., 2004).

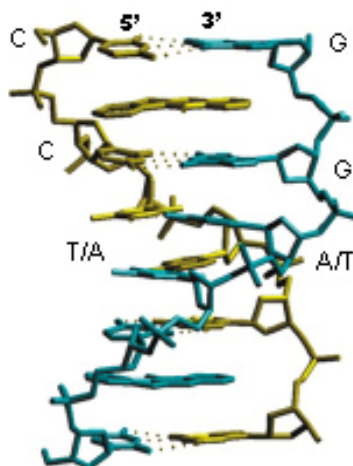


Fig. 14. Estructura del complex Criptolepina-DNA. Estructura cristal·logràfica de l'apilament o *stacking* de la Criptolepina entre el doblet de citosines de l'hexanucleòtid d(CCTAGG). Figura modificada (Lisgarten et al., 2002b).

II. DOS FÀRMACS INTERCALANTS: DAUNORUBICINA I CRIPTOLEPINA

En aquesta tesi s'aprofunditzarà en l'estudi de dues molècules de baix pes molecular que s'uneixen a l'estructura de la doble hèlix de DNA, la Daunorubicina i la Criptolepina mitjançant la intercalació en regions riques en GC. Cada agent terapèutic té especificitat per una seqüència, sent la de la Daunorubicina 5'(A/T)CG3', i la de la Criptolepina 5'GG 3'. Un altre tret diferencial és la ubicació de la molècula en la doble hèlix, la Daunorubicina s'intercala perpendicularment als ponts d'hidrogen, en canvi la Criptolepina ho fa paral·lelament (Lisgarten et al., 2002a).

II.1. Daunorubicina

Fa més de quaranta anys, diversos assaigs clínics varen demostrar l'activitat antineoplàsica de les antraciclina. Avui en dia representen un dels grups d'antitumorals amb major espectre d'activitat en càncers humans (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004; Weiss, 1992).

La majoria de les antraciclina són antibiòtics naturals, producte de la fermentació de la bactèria *Streptomyces peucetius*, o són productes semisintètics que s'obtenen modificant parts de la molècula després de la síntesi microbiana. Una part important en l'estudi d'aquestes molècules és l'obtenció del fàrmac, ja sigui mitjançant

síntesi química, com la Idarubicina o per enginyeria genètica optimitzant la síntesi i la producció de les antraciclins (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). D'entre totes les moltes antraciclins obtingudes, la Daunorubicina (Daunomicina) està entre les quatre usades en la quimioteràpia actual. La Daunorubicina és el fàrmac més utilitzat en el tractament de leucèmies linfocítiques agudes (Gewirtz, 1999; Weiss, 1992). També presenta alguna activitat enfront tumors sòlids en nens, tot i que l'activitat anticancerígena en tumors sòlids en adults és molt baixa (Booser and Hortobagyi, 1994; Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004).

II.1.1 Mecanismes d'acció de la Daunorubicina

S'ha demostrat mitjançant diferents experiments que la diana principal de la Daunorubicina és el DNA (Chaires, 1996; Valentini et al., 1985). Al intercalar-se en la doble hèlix inhibeix la síntesi de DNA, interfereix amb l'helicasa i en la separació de les cadenes, i provoca danys al DNA degut a la inhibició de la topoisomerasa II (Binaschi et al., 2001; Chaires, 1996). A elevades dosis intracel·lulars, el fàrmac interfereix en els processos de tall i relligament realitzats per la topoisomerasa II, mecanismes d'acció necessaris per la duplicació, la transcripció i la reparació d'errors del DNA (Gewirtz, 1999).

Tot i que la propietat intercaladora al DNA de la Daunorubicina és imprescindible per inhibir el creixement tumoral (Valentini et al., 1985), no està definida la relació entre els efectes que produeix: la inhibició de la síntesi del DNA i del creixement cel·lular i la inducció de l'apoptosi (Gewirtz, 1999; Perego et al., 2001). Recentment, s'ha descrit que el mecanisme antiproliferatiu de l'antraciclina en cèl·lules humanes és depenent de la dosi, induint l'apoptosi, la senescència cel·lular o la catàstrofe mitòtica depenent de la concentració de fàrmac (Mansilla et al., 2003; Mansilla et al., 2006).

Tal com s'ha mencionat anteriorment, la unió de la Daunorubicina al DNA pot produir una inhibició de la transcripció gènica (Gewirtz, 1999; Marin et al., 2002; Portugal et al., 2001). La inhibició de la síntesi del mRNA és deguda a la capacitat competidora de la Daunorubicina amb els factors de transcripció per les seqüències diana del DNA (Dickinson et al., 1998; Mansilla et al., 2004; Martin et al., 1999). Partint de què la regulació de l'expressió gènica es dona principalment a nivell de la transcripció (Gniazdowski et al., 2003; Gottesfeld et al., 2000), l'estudi i el desenvolupament de fàrmacs capaços de regular l'expressió dels gens en aquest nivell,

és una eina terapèutica potencialment efectiva en el tractament del càncer. No obstant, s'ha demostrat que l'afinitat de la Daunorubicina i altres antraciclins pel DNA és menor que la dels factors de transcripció per les seves dianes gèniques. La constant d'afinitat per la Daunorubicina és al voltant de 10^7 M^{-1} (Chaires, et. al. 1989), aproximadament quatre ordres menor que la d'un factor de transcripció, paràmetre que es compensa amb els efectes provocats pel fenomen de la intercalació, que causa la distorsió física de la doble hèlix que disminueix l'afinitat del factor per la seqüència diana. Per altra banda, cal considerar la concentració intracel·lular del fàrmac, superior que la del factor de transcripció.

Independentment de la capacitat intercaladora al DNA, s'han descrit altres mecanismes d'acció de les antraciclins, com ara la formació de radicals lliures, peroxidació lipídica i efectes directes sobre la membrana plasmàtica (Gewirtz, 1999; Kule et al., 1994; Minotti et al., 2004). Els radicals lliures es formen a partir de la reducció de l'anell C de la quinona. L'anell C pot actuar com a acceptor d'un o dos electrons en reaccions donades pel citocrom p450 reductasa, NADH deshidrogenasa i la xantina oxidasa, reduir-se i formar el radical lliure semiquinona. Les semiquinones podrien interaccionar amb molècules d'oxigen i desencadenar la formació de nous radicals com el superòxid, l'hidroxil o el peròxid. Aquests radicals lliures són els responsables de la inhibició de la fosforilació oxidativa i la inducció de la peroxidació lipídica de les membranes plasmàtiques cel·lulars (Booser and Hortobagyi, 1994).

II.1.2 Intercalació específica de la Daunorubicina en el DNA

La seqüència preferent d'unió al DNA es va caracteritzar mitjançant *footprinting* entre altres tècniques (Chaires et al., 1990). Les interaccions moleculars que es donen per estabilitzar el complex Daunorubicina-DNA s'han definit mitjançant anàlisis de difracció de raigs X d'alta resolució per (Frederick et al., 1990). Aquestes tècniques han permès definir la posició de l'estructura de Daunorubicina al llarg del solc estret del DNA, tenint una preferència per la seqüència 5'(A/T)CG 3' (Chaires et al., 1990). Els anells B, C i D del cromòfor (Fig. I5) s'intercalen entre la citosina i la guanina (Fig. I3), mentre que l'anell A confereix estabilitat al complex a través de ponts d'hidrogen. El segon domini de la molècula, el sucre anomenat, daunosamina, s'uneix al solc estret i aporta especificitat a la unió (Priebe et al., 2001).

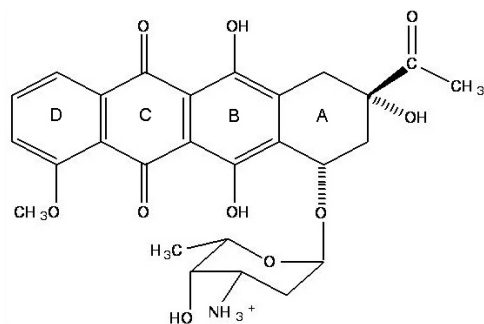


Fig. 15. Estructura química de la Daunorubicina.

Les estructures cristal·logràfiques defineixen el complex Daunorubicina-DNA amb una estequiometria de 2:1 per a un l'hexàmer d(CCTACG) (Figs. I3 i I6). Cada parell de molècules intercalades en l'hexanucleòtid es disposen cada una en un extrem amb la daunosamina apuntant al centre del solc menor: entre ambdós grups hi ha una distància de 6Å, aproximadament (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001).

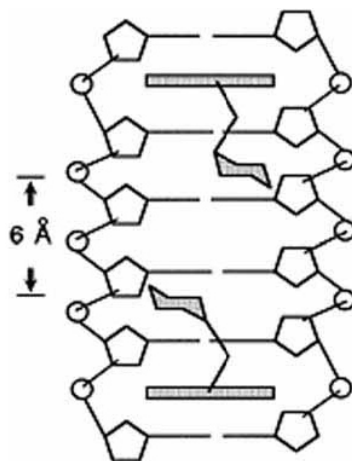


Fig. 16. Estructura del complex format per la unió de dues molècules de Daunorubicina en l'hexàmer d(CCTACG) segons els resultats de les tècniques cristal·logràfiques. Els cromòfors (rectangles) s'intercalen en el solc menor, mentre les daunosamines es posicionen al llarg del solc menor. Els grups 3'NH₂ de les daunosamines es troben a una distància d'aproximadament 6Å.

II.2. Criptolepina

La medicina tradicional sempre ha recorregut al món vegetal a la recerca de guariments. La ciència i la medicina actual encara intenten comprendre el mecanisme d'acció de molts dels principals compostos actius amb propietats terapèutiques aïllats de plantes. Els extractes de la *Cryptolepis sanguinolenta* han estat usats a Àfrica com a remei pel reumatisme, infeccions respiratòries i urinàries, i contra la malària.

E. Clinquart als anys trenta, va ser el primer en aïllar de les arrels d'aquesta planta el seu principal alcaloide: la Criptolepina (Wright et al., 2001). Anys després, aquest alcaloide s'aïllà en plantes d'una altra família, comuns en l'oest africà (Banzouzi et al., 2004; Karou et al., 2003).

La Criptolepina té associats una gran varietat d'efectes farmacològics, propietats antipirètiques i hipotensives, activitat bloquejant d'adrenoreceptors, activitat antimuscarínica, antiinflamatòria, antibacteriana i antimalàrica (Wright et al., 2001).

II.2.1 Mecanismes d'acció de la Criptolepina

S'ha descrit el DNA com a diana potencial per a la Criptolepina (Bonjean et al., 1998; Lisgarten et al., 2002b). La intercalació al DNA, entre altres factors, podria explicar l'elevada citotoxicitat detectada *in vitro*, en cèl·lules humanes i de mamífer (Ansah and Gooderham, 2002; Bonjean et al., 1998; Dassonneville et al., 1999). La unió al DNA de la Criptolepina reprimeix la síntesi de DNA en cèl·lules cancerígenes (Bonjean et al., 1998). Un comportament típic d'un agent intercalador, com la Criptolepina, és la inducció de trencaments de la doble hèlix (Ansah et al., 2005) ja que estableix el complex covalent topoisomerasa II-DNA, promovent el talls del DNA i impeding el control dels estats topològics de l'hèlix per l'enzim (Dassonneville et al., 1999). L'influència en l'activitat de la topoisomerasa i la lleu inhibició de la telomerasa, s'explica justificant la preferència de l'intercalant per regions tríplex i per la semblança estructural d'aquests enzims (Guittat et al., 2003). Per altra banda, s'han trobat inhibides algunes proteïnes que no interaccionen directament amb el DNA, com és el cas de la polimerasa catalitzadora de la transferència de l'ADP-ribosa, relacionada amb la reparació del dany al DNA (Dassonneville et al., 2000).

Alguns estudis apunten que cèl·lules tumorals tractades amb Criptolepina, desencadenen una resposta apoptòtica donada per la inducció de l'activitat proteolítica de la caspasa 3, i la posterior alliberació del citocrom c des del mitocondri, encara que aquests resultats són, avui per avui, polèmics (Ansah and Gooderham, 2002; Ansah et al., 2005; Dassonneville et al., 2000). Aquest tipus d'estudi, recolzen la possibilitat que la Criptolepina pugui ser usada en el tractament del càncer (Zhu and Gooderham, 2006).

La Criptolepina presenta una elevada activitat envers el paràsit de la malària *Plasmodium falciparum* (Noamesi et al., 1991; Onyeibor et al., 2005; Wright et al., 2001) donada per un mecanisme independent a la intercalació en l'àcid nucleic (Jonckers et al., 2002). Aquesta activitat antiplasmodial segueix un patró de tipus

cloroquina (*chloroquine-like*), que ve donada per la inhibició de la conversió del grup hemo en el pigment tòxic de la malària, anomenat hemozoïna, resultat de la ingesta i la degradació de l'hemoglobina en la vacuola àcida del paràsit *Plasmodium* (Arzel et al., 2001; Van Miert et al., 2004).

II.2.2 Intercalació específica de la Criptolepina en el DNA

Es varen definir les regions riques en C-G com a preferents per a la intercalació de la Criptolepina mitjançant assaigs de diàlisi competitiva (Lisgarten et al., 2002b), trobant una certa especificitat per les CC no alternants, tal com varen demostrar assaigs de *footprinting* (Bonjean et al., 1998; Dassonneville et al., 1999). A part d'intercalar-se entre doblets de bases nitrogenades, estudis d'espectrometria de masses varen determinar el reconeixement d'estructures tríplex i quàdruplex del DNA per part de la Criptolepina (Guittat et al., 2003). La interacció fàrmac-DNA es va cristal·litzar, i es va observar la intercalació als llocs d(CpC)-d(GpG) del fragment de DNA d(CCTAGG)₂, sent la primera molècula descoberta amb preferència d'unió per a llocs CC no alternants (Fig. I2) (Lisgarten et al., 2002b). L'asimetria de la Criptolepina (Fig. I7) confereix un perfecte *stacking* (apilament) entre les dues citosines no alternants sense la formació de ponts d'hidrogen (Figs. I2 i I4). L'anell aromàtic es posiciona enmig de les dues citosines quedant la part de l'anell doble entre les dues guanines (Fig. I2). El grup carregat positivament (la quinona) queda encarat al solc major cap a les guanines i l'indol cap a les citosines, en el solc menor, ambdós confereixen estabilitat al complex fàrmac-DNA (Fig. I2). L'anell de cinc carbonis, a part de donar l'asimetria, aporta una lleugera curvatura a la molècula, condicions que contribueixen al perfecte posicionament en la doble hèlix. La Criptolepina està intercalada paral·lelament als ponts d'hidrogen de les bases i la distància entre molècules de Criptolepina al cristall, és de 7 Å (Lisgarten et al., 2002b).

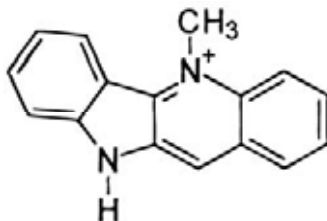


Fig. I7. Estructura química de l'alcaloide Criptolepina.

III. EL LLEVAT *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COM A EINA D'ESTUDI

El disseny i desenvolupament de fàrmacs anticancerígens té com a objectiu l'identificació de compostos que eliminin o inhibeixin el creixement de les cèl·lules tumorals, però no les cèl·lules normals. Tot i la diversitat de les diferents malalties que s'agrupen sota el terme de càncer, una propietat que tots els tumors comparteixen és l'acumulació de mutacions que les fan diferents de les cèl·lules normals. Les divergències genètiques entre les cèl·lules tumorals i les homòlogues normals, inclouen mutacions sense sentit, amplificacions, reordenacions i delecions, a més de canvis epigenètics. Un dels principals objectius a l'hora de desenvolupar teràpies contra el càncer és identificar estratègies basades en les diferències entre cèl·lules normals i tumorals. En general, els fàrmacs amb menys activitat terapèutica, és a dir, els més citotòxics però amb un elevat grau d'inespecificitat, han sigut els identificats mitjançant anàlisis de citotoxicitat. Per identificar agents terapèutics més direccionats i específics s'han desenvolupat assaigs *in vitro* per estudiar dianes específiques i predeterminades (Koutsoukos et al., 1994; Shoemaker et al., 1983; Shrivastav et al., 1980), assaigs cel·lulars o *cell-based* que mitjançant l'activació d'un gen marcador o per toxicitat selectiva, o validacions globals amb organismes model (Bedalov et al., 2001; Perkins et al., 2001; Tugendreich et al., 2001). El disseny d'aquests assaigs pot estar encarat a identificar les dianes específiques, vies metabòliques o processos metabòlics.

La gran majoria de les anàlisis per determinar els efectes dels agents terapèutics es poden desenvolupar en organismes model tal com el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca *Drosophila melanogaster* o el nematode *Caenorhabditis elegans*, des del nivell genètic, fins al fenotípic. Els organismes model aporten l'avantatge d'un sistema simple, homogeni i inalterat des del punt de vista genètic. D'altra banda, les tècniques de manipulació genètica dels organismes model permeten reproduir els canvis genètics de cèl·lules cancerígenes humanes. Tot això fa que els organismes model siguin importants eines per avaluar els efectes dels fàrmacs i determinar-hi les respostes cel·lulars, la seva sensibilitat i fins i tot el mecanisme d'acció a nivell molecular.

Saccharomyces cerevisiae és l'organisme eucariòtic més manipulable i un dels més simples. És un dels microorganismes més arrelats a la nostra cultura. El lligam amb el llevat prové dels nostres ancestres quan l'usaven per la producció de pa i begudes alcohòliques. No és estrany doncs, que fos el primer organisme en seqüenciar-se el genoma, al 1996 per un grup liderat per André Goffeau, i això el posiciona com un dels

sistema model més emprat en la biologia molecular i cel·lular de tots els temps, englobant estudis de processos i vies rellevants pels eucariotes superiors (Goffeau et al., 1996). Per exemple, s'ha usat com a sistema d'estudi per entendre el mecanisme d'acció de molts agents terapèutics i el desenvolupament de malalties, com el cas del càncer (Gourlay et al., 2006; Hartwell, 2002), o malalties neurodegeneratives, com l'enfermetat de Huntington o el Parkinson (Outeiro and Giorgini, 2006). Estudis comparatius han demostrat que un 40% de les proteïnes del llevat comparteixen, al menys, amb una proteïna humana similitud de la seqüència aminoacídica (Parsons et al., 2003) i un 30% dels gens implicats en malalties humanes tenen el seu ortòleg en el llevat (Foury, 1997).

Els avantatges que aporta el llevat en l'estudi i desenvolupament d'agents terapèutics són diversos, el cicle cel·lular és ràpid ja que el temps de duplicació és d'aproximadament 90 minuts, característica que permet examinar en relativament poc temps, agents en varies generacions, el medi de cultiu és senzill i barat, a més poden créixer en medi líquid o sòlid, poden créixer aeròbica o anaeròbicament, depenent de la font de carboni. Poden existir en haploïdia o en diploïdia, a més se'ls pot induir creixement pseudohifal, senyalització intracel·lular i mort cel·lular programada. L'elevada eficiència de transformació i de la recombinació homòloga permet que manipular-los genèticament sigui fàcil (disrupcions i delecions genètiques, reinsertions i duplicacions).

Aquests avantatges han permès desenvolupar estratègies per identificar i avaluar agents anticancerígens en un context determinat, podent avaluar els efectes de les alteracions gèniques. Els assaigs de desenvolupament i de validació d'agents terapèutics que usen el llevat com a sistema model es basen, principalment en les següents aproximacions experimentals; delecio i sobreexpressio de gens, induccio de l'haploinsuficiencia, mapes d'interaccions de proteïnes (doble híbrid i *small-molecule three-hybrid*) i perfils d'expressio gènica. La gran quantitat de dades generades per aquestes aproximacions, si a més es combinen amb disciplines tals com la bioinformàtica, el modelatge matemàtic, o la bioenginyeria, col·loquen al llevat com a capdavanter en el camp de la biologia de sistemes.

III.1 Efecte de la deleció gènica en la sensibilitat al fàrmac

En soques haploides de *Saccharomyces cerevisiae* la deleció de gens no essencials, el producte dels quals pot interaccionar funcionalment amb la diana específica del fàrmac, permet detectar canvis en la sensibilitat al fàrmac, inclús si la diana del fàrmac és el producte d'un gen essencial (Ooi et al., 2006).

El projecte de deleccions gèniques del llevat es va realitzar mitjançant un consorci internacional, el qual consistí en crear sistemàticament mutants de gairebé totes les seqüències codificants (ORF's) anotades del *Saccharomyces cerevisiae*. Les dues principals col·leccions de soques mutants del *S.cerevisiae* són *Saccharomyces Genome Deletion Project* (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/) i *European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis* o EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>). Cada gen es va reemplaçar per un casset (kanMX4) que confereix resistència a G418 (Giaever et al., 2002; Winzeler et al., 1999). Aquesta tècnica permet l'estudi d'un gran nombre de gens per exemple, un grup van analitzar fins a 2226 soques (cadascuna amb un gen relacionat) per a l'immunosupressor rapamicina (Chan et al., 2000)

Els assaigs de *synthetic-lethal* es basen en la combinació de dues mutacions de gens no essencials que desencadenen en un organisme inviable, per exemple es creuren 132 soques mutants seleccionades amb 4700 soques mutants viables. Aquest tipus d'anàlisi permetrà identificar 1000 interaccions de *synthetic-lethal* en les soques resultants (dobles mutants) (Tong et al., 2004).

La *synthetic fitness* indica un defecte major en el creixement quan es dona la combinació de dues mutacions no letals que l'obtingut per a cadascuna d'aquestes per separat. La interpretació de la *synthetic fitness* és que la reflecteix interaccions genètiques importants, mentre que *synthetic-lethality* reflecteix una interacció essencial (Ooi et al., 2006). La *synthetic-lethality* és una eina per identificar la funció o funcions del gen d'interès i/o de la via en la qual està implicat (Bender and Pringle, 1991).

Una avaluació múltiple d'interaccions gèniques de soques letals sintètics serveix per correlacionar gens que codifiquen proteïnes implicades en el mateix ambient molecular (amb funcions substituents o implicades en la mateixa via), o que interaccionen en ambients distants. A partir d'aquest principi es poden extrapolar relacions més complexes, per exemple, donat dos gens amb parelles comuns en assaigs de *synthetic-lethality* se'ls hi descriu una elevada probabilitat d'interaccionar físicament,

tal com s'observa en bases de dades d'experiments de dos híbrids o de complexes proteics (Tong et al., 2004). Pel *Saccharomyces cerevisiae* s'ha desenvolupat un mètode per l'anàlisi d'un gran nombre de dobles mutants anomenat *Synthetic Genetic Array* (SGA) (Tong et al., 2001).

Aquestes soques mutants són de gran valor pels anàlisis funcionals d'ampli espectre, ja que poden servir com a punt de partida per a posteriors anàlisis funcionals. Per exemple, créixer dobles mutants en diversos medis i condicions, poden revelar interaccions genètiques no perceptibles en assaigs estàndards on les cèl·lules creixen en medi ric en glucosa (Parsons et al., 2004). Els anàlisis globals de *synthetic-lethality* generen una sèrie d'interaccions gèniques que permeten dissenyar les vies cel·lulars, en canvi, en estudis simples restarien emmascarades, per tant, proporcionen quantitats rellevants d'informació a l'hora de comprendre els processos cel·lular (Nehil et al., 2007). Amb aquest tipus d'estudi es poden identificar gens involucrats en diversos processos biològics com la meiosi, la respiració mitocondrial, la mida cel·lular, o la resposta cel·lular a diversos estressos i fàrmacs, per exemple, al comparar els perfils obtinguts pel 12 compostos amb mapes d'interaccions genètiques, es va identificar un grup de gens comuns implicats en el complex de resistència a fàrmacs (Cardenas et al., 1999; Parsons et al., 2004), així, compostos que provoquen toxicitat selectiva per a certs mutants podrien pertànyer a la mateixa via, a una paral·lela o estar correlacionada amb la deleció gènica. Una variant del concepte de *synthetic lethality* s'aplica a l'estudi de molècules petites capaces d'actuar com a potenciadors o supressors de fàrmacs com la FK506 (Butcher and Schreiber, 2003) i la rapamicina (Huang et al., 2004).

Una gran quantitat de compostos biològicament actius travessen fàcilment la membrana del llevat, aquest número encara pot ser més elevat si s'altera la membrana plasmàtica, o les bombes d'aflux responsables de la destoxicació de xenobiòtics (Simon and Bedalov, 2004). Validacions de fàrmacs d'ampli espectre (National Cancer Institute, NCI) han usat soques mutants pel gen *ERG6*, implicat en els darrers estadis de la síntesi de l'ergosterol. L'*ERG6* és una D(24)-esterol C-metiltransferasa, converteix el zimosterol en fecosterol en la via biosintètica de l'ergosterol, mitjançant la metilació de l'esterol en la posició C-24. L'ergosterol és el lípid majoritari de la membrana plasmàtica, també es troba en les estructures lipídiques de partícules i en la membrana mitocondrial externa (Gaber et al., 1989). La disrupció de l'*ERG6* altera la membrana plasmàtica i permet augmentar la permeabilitat als fàrmacs (Emter et al., 2002; Kaur and Bachhawat, 1999), incrementant la sensibilitat per a una àmplia varietat de

compostos estructuralment diversos; inhibidors de la síntesi i del metabolisme de l'esterol, a agents antifúngics a dosis baixes, i a agents amb propietats clíniques (Hemenway and Heitman, 1996; Jensen-Pergakes et al., 1998; Marin et al., 2002; Markovich et al., 2004). S'ha observat que en alguns casos, les soques mutants per l'*ERG6* aporten resistència per al fàrmac, per exemple, a antifúngics que afecten específicament la membrana plasmàtica (Anderson et al., 2003).

III.2 Resposta transcripcional al tractament amb el fàrmac

L'estudi a nivell transcripcional dels agents terapèutics es basa en la detecció dels nivells de missatger que hi ha en la cèl·lula després del tractament degut a canvis en la regulació transcripcional.

El mètode clàssic per detectar els nivells de trànscrips d'un gen és el *Northern-blot* (Alwine et al., 1977) que permet identificar la presència d'un RNA missatger complementari a la sonda (fragment de RNA o cDNA) d'interès. El *Northern-blot* a part de detectar la presència i per tant, poder semiquantificar la quantitat de missatger present, permet determinar la mida de la transcripció pel mRNA d'estudi. Un dels desavantatges del *Northern-blot* és la gran quantitat d'RNA necessari per al desenvolupament de la tècnica, aproximadament 25µg d'RNA total de llevat. Per a detectar l'expressió gènica a partir de quantitats menors d'RNA s'utilitza la tècnica de la RT-PCR, en qual l'RNA es retrotranscriu i després s'amplifica mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). La RT-PCR és una tècnica semiquantitativa que requereix d'una optimització en el número de cicles d'amplificació per poder avaluar la quantitat de trànscrips en la fase logarítmica. La qRTPCR suposa una millora d'aquesta tècnica que gràcies a la incorporació de fluorocroms en el pas d'amplificació del DNA permet identificar en temps real la quantitat d'amplicó (Kubista et al., 2006). La qRTPCR és avui en dia, la tècnica de preferència a l'hora de la quantificació tant absoluta com relativa dels nivells transcripcionals d'un gen.

Els mètodes anteriorment descrits, s'empren l'anàlisi de l'expressió gènica d'un nombre limitat de gens, són tècniques difícilment aplicables a estudis d'ampli espectre. Actualment, una de les eines més utilitzades que disposa la genòmica per tal d'obtenir informació a gran escala dels nivells d'expressió gènica són els microarrays, dissenyats per primer cop al 1995 per Schena (Schena et al., 1995). Un microarray de DNA consisteix en un gran nombre de molècules de DNA ordenades sobre un suport sòlid,

freqüentment portaobjectes de vidre o membranes de niló, de manera que formen una matriu ordenada de seqüències en dos dimensions. Aquests fragments de DNA immobilitzats en el suport s'anomenen sondes. Les sondes poden ser seqüències de poca longitud (oligonucleòtids) o de major longitud com cDNA (DNA complementari sintetitzat a partir de mRNA). Una altra variant de sondes poden ser productes de PCR, replicació *in vitro* de seqüències de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa.

Els àcids nucleics de les mostres a analitzar es marquen utilitzant diferents mètodes (fluorescents i radioactius), es mesclen junt amb les sondes disposades en el suport sòlid, i s'incuba permetent la unió de les seqüències homòlogues (Fig. 18). Durant aquest procés d'hibridació, les mostres d'àcids nucleics s'uniran a les seves complementàries immobilitzades en el suport del microarray, permetent la identificació i quantificació de DNA present en la mostra. La hibridació es quantifica mitjançant la detecció del senyal i els programes informàtics permetran analitzar i interpretar les dades obtingudes.

Els primers microarrays dissenyats amb el genoma d'un organisme foren els del *Saccharomyces cerevisiae* (Shalon et al., 1996). L'ús d'aquesta tècnica, és d'ampli espectre ja que l'anàlisi de la resposta transcripcional és aplicable a un rang molt ampli de condicions, des d'estudiar fàrmacs fins a entendre les interrelacions que regulen el metabolisme del llevat. S'han caracteritzat patrons específics en els canvis d'expressió en resposta a alguns tractaments amb fàrmacs (Hughes et al., 2000; Marton et al., 1998).

Els microarrays han aportat una gran quantitat de dades al camp de la genòmica. Paral·lelament a l'obtenció d'aquestes grans quantitats de valors i al desenvolupament de tècniques computacionals, s'han establert extenses bases de dades, a continuació es mostren unes de les més importants; *Stanford Microarray database* (<http://genome-www5.stanford.edu/>), específiques del llevat, *Yeast Microarray Global Viewer* o yMGV (<http://www.transcriptome.ens.fr/yimgv/>), *Saccharomyces Genome Database* o SGD (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/expression/expressionConnection.pl>). Suport indispensable per comprendre i poder determinar els mecanismes de fàrmacs sense una diana específica definida.

Els perfils d'expressió definits mitjançant els microarrays de cDNA o els d'oligonucleòtids permeten descriure respostes cel·lulars globals d'expressió gènica enfront diversos estímuls o fases del cicle cel·lular (Young, 2000). Mètodes d'agrupació jeràrquica (*Hierarchical clustering*) permeten assignar els gens en grups segons el patró

d'expressió compartit. L'expressió d'aquests gens estarà coregulada al llarg del temps o en resposta a tractaments específics. Els factors de transcripció són els majors responsables de regular els nivells de mRNA dels gens, els quals s'uneixen a regions reguladores en *cis* del DNA adjacent a la regió codificadora del gen. La combinació de tècniques computacionals amb el microarrays de DNA, els arrays d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i mapes de correlació cromosòmica, entre altres, ha aportat una millora en la comprensió de les xarxes reguladores de la transcripció en el *S.cerevisiae* (Lee et al., 2002; Shannon and Rao, 2002).

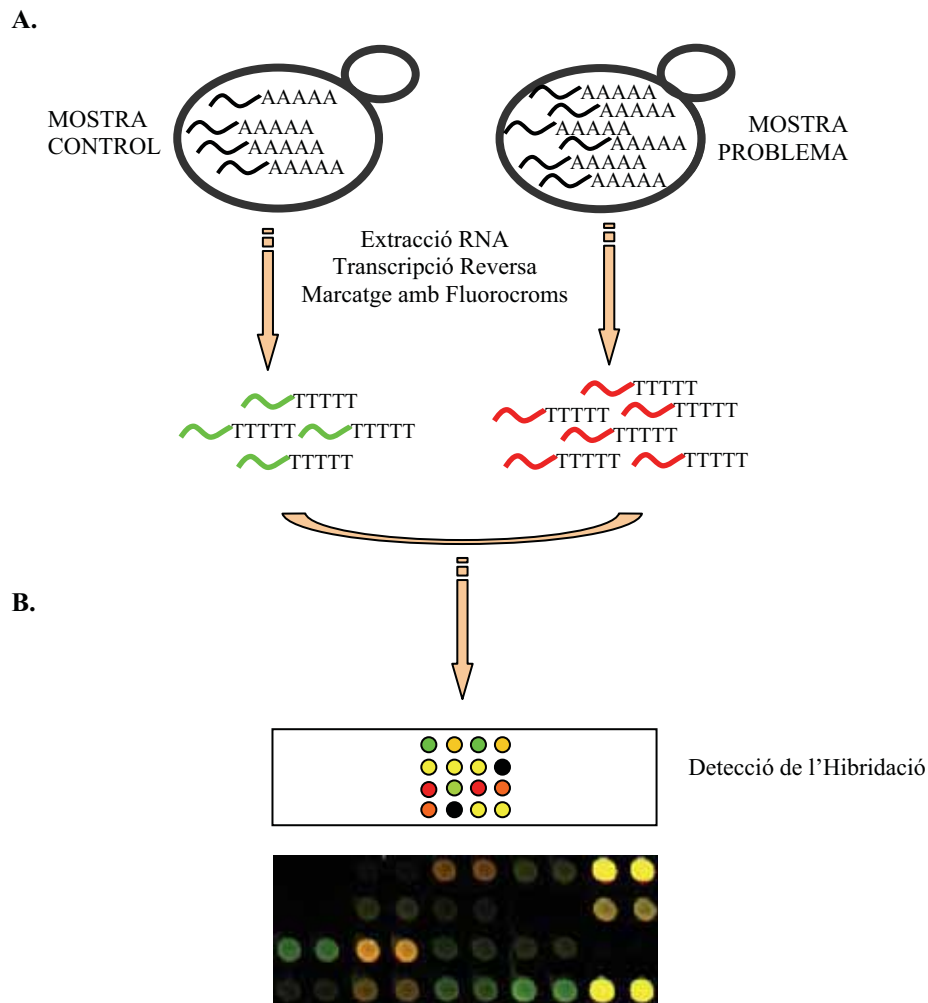


Fig. 18. Representació gràfica de la tècnica dels microarrays de DNA per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial en *Saccharomyces cerevisiae*. **A.** Esquema d'un experiment de microarrays de DNA de llevat. Figura modificada de Horak et Snyder, 2000. **B.** Porció de la imatge obtinguda després de la hibridació d'un microarrays de DNA de llevat.

III.3 Regulació de la transcripció

El fenotip d'un organisme està en gran part determinat pels gens que s'expressen. L'expressió gènica es representa en l'anomenat transcriptoma, el qual transmet per a una població cel·lular definida, la identitat de cada gen expressat i els seus nivells d'expressió. A diferència del genoma el qual és essencialment estàtic, el transcriptoma pot ser modulats tant per factors externs, com interns. Sent el transcriptoma el vincle entre el genoma de l'organisme i les seves característiques físiques.

Tot i que les cèl·lules de llevat no evolucionen formant organismes pluricel·lulars, sí que canvien els seus patrons d'expressió, no només com a conseqüència dels programes interns (cicle cel·lular, esporulació, etc.), sinó que també com a resposta de senyals externes tals com canvis ambientals. Els mecanismes implicats en la regulació de la transcripció estan prou ben representats entre els eucariotes, i en molts casos és possible combinar components amb diferents orígens (llevat, mosques, mamífers) i recuperar, al menys, part de la funció (Piña, 2000).

III.3.1 Activació del metabolisme de la galactosa

El *Saccharomyces cerevisiae* utilitza una gran varietat de sucres com a font de carboni i d'energia. El llevat al créixer en una font de carboni diferent de la glucosa o la fructosa requereix importants canvis en els patrons d'expressió de molts gens, els quals estaran reprimits al créixer en qualsevol dels dos sucres esmentats.

El llevat al créixer en galactosa, un epímer de la glucosa, li és relativament fàcil degut a la similitud estructural amb la glucosa. No obstant, un conjunt de 12 gens, els gens *GAL*, són necessaris per aquest mecanisme. Molts d'aquests gens estan regulats a nivell d'expressió gènica depenent de la presència de glucosa en el medi (Johnston and Carlson, 1992). L'expressió dels gens *GAL* depèn de l'existència de seqüències específiques de DNA en la regió promotora, anomenades UASgal (*Upstream Activating Sequences*), les quals la proteïna d'unió al DNA Gal4p reconeixerà. La transcripció dels gens *GAL* requereixen la unió de Gal4p al lloc UASgal en els seus promotors, i de l'activació per part d'aquest, si no persisteixen silenciats. El factor Gal4p només es transcriu en absència de glucosa al medi, i s'uneix al llocs UASgal formats per la seqüència d'unió consens palindròmica CGGA(G/C)GACAGTC(C/G)TCCG (Giniger et al., 1985). Per tal d'induir l'expressió dels gens *GAL*, Gal4p requereix la desregulació per part del supressor Gal80p, ja que en absència de glucosa, Gal80p s'uneix en el

principal domini activador de Gal4p impeditint que realitzi la funció activadora sobre els gens *GAL* (Sadowski et al., 1996). En presència de galactosa l'acció repressiva de Gal80p és suprimida per la interacció de Gal3p (Piña, 2000), donant lloc a la inactivació de Gal80p i la inducció dels gens *GAL* (Fig. 19).

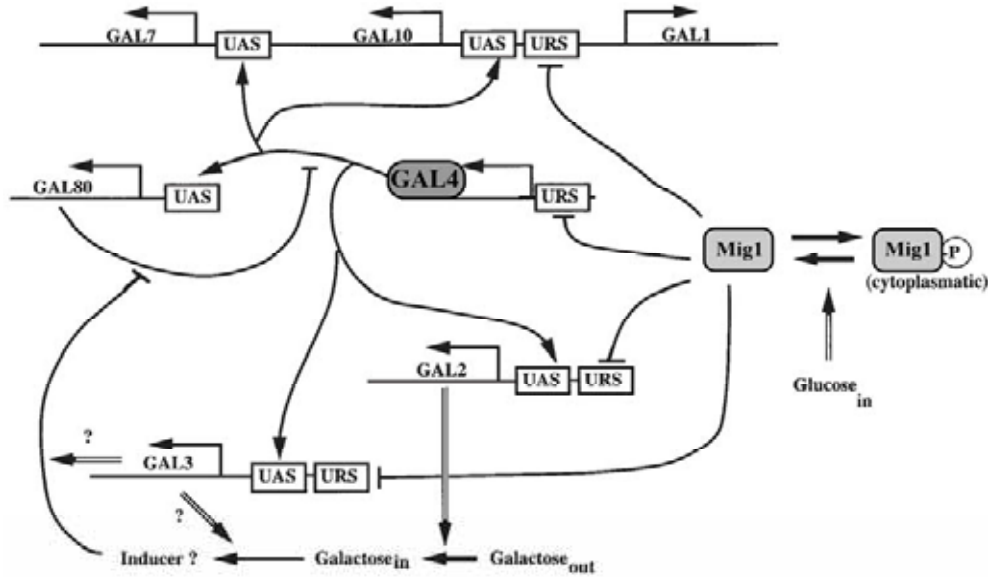


Fig. 19. Vies de regulació dels gens *GAL*. El gràfic indica l'activació transcripcional (⇓), la repressió (⊥) i les activitats enzimàtiques (⇨). Transferència del sucre i la modificació química estan representats amb fletxes gruixudes (→). Els interrogants (?) indiquen passos no ben definits. Gràfic modificat de (Piña, 2000).

Objectius

El treball realitzat en aquesta tesis s'emmarca dins d'un projecte d'investigació que té per objectiu principal l'estudi dels efectes dels antitumorals intercalants Daunorubicina i Criptolepina en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Els objectius plantejats en aquesta Tesis en concret varen ser els següents:

I. Determinar l'efecte citotòxic dels antitumorals Daunorubicina i Criptolepina en diverses soques de *S. cerevisiae*.

II. Avaluar la resposta transcripcional per a cada intercalant:

- Identificar els gens amb una expressió gènica diferencial en cadascun dels tractaments, en funció de la concentració i del temps en presència del fàrmac.
- Identificar les principals categories funcionals afectades en cada condició.
- Validar els resultats obtinguts mitjançant una tècnica quantitativa.
- Identificar possibles mecanismes d'actuació dels fàrmacs.