

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

Discussió

El DNA i els enzims del metabolisme del DNA són els elements potencialment reconegut per molts agents antitumorals, tals com la Daunorubicina i la Criptolepina. El coneixement detallat dels mecanismes d'acció dels agents terapèutics és un requisit per desenvolupar teràpies antitumorals més selectives i efectives. En el present treball s'han analitzat els efectes d'aquests dos fàrmacs intercalants al DNA en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

Ambdós fàrmacs avaluats s'uneixen al DNA en regions riques en C/G, encara que cadascun d'ells té especificitat per a una seqüència diferent. L'activitat antitumoral de la Daunorubicina depèn de la unió al DNA, mitjançant la intercalació preferentment en la seqüència 5'(A/T)CG3' (Chaires et al., 1990). Aquesta especificitat de seqüència permet que el fàrmac interfereixi amb aquells factors de transcripció que la seqüència de reconeixement en els promotors coincideix parcialment amb la del fàrmac (Marin et al., 2002; Portugal et al., 2001).

La Criptolepina és un fàrmac amb aplicacions recents en la teràpia contra el càncer (Dassonneville et al., 2000; Seville et al., 2007; Zhu and Gooderham, 2006) i en el camp dels antimalàrics (Wright et al., 2001). La propietat més rellevant de la Criptolepina és que és l'única molècula coneguda fins al moment que s'intercala al DNA en regions CC/GG no alternants (Lisgarten et al., 2002a).

Regions riques en G/C són presents al llarg del genoma humà i del llevat. Promotors de gens humans com ara oncògens, supressors de tumors, factors de regulació del cicle cel·lular, i gens constitutius, fins i tot, per alguns gens de mamífer s'ha identificat la presència de seqüències riques en CG (entre 6-7 nucleòtids) amb una distribució no aleatòria (Mansilla and Portugal, 2002). Altres regions són els telòmers, estructures de nucleoproteïnes encarregades de protegir les parts cromosòmiques terminals dels processos com la reparació del DNA o la degradació. A més, els telòmers i algunes regions subtelomèriques, principalment consisteixen en repeticions en tàndem de seqüències riques en guanines, la seqüència descrita tant pels d'humans com els de llevat està composta bàsicament d'una seqüència repetida, TTAGGG en humans, i TG₍₁₋₃₎ pel *S.cerevisiae* (Flint et al., 1997). Es coneix l'existència de factors de transcripció específics de les repeticions telomèriques així com proteïnes que s'uneixen en aquestes regions, les quals s'encarreguen de conservar l'estructura d'heterocromatina i protegir la cadena senzilla terminal (Blasco, 2007).

En ambdós casos, la intercalació dels fàrmacs en l'àcid nucleic podria desencadenar una alteració del transcriptoma, entre altres efectes. El desenvolupament

de molècules de baix pes molecular amb capacitat d'interferir amb l'expressió de gens específics, pot ajudar a la millora de les teràpies actuals per a combatre malalties humanes (Gottesfeld et al., 2000; Priebe et al., 2001), ja que podrien estar bloquejant vies metabòliques específiques necessàries per al creixement cel·lular. Tanmateix el coneixement del mecanisme d'acció dels antitumorals actualment usats en clínica, beneficiaria el disseny de nous agents terapèutics.

En aquesta tesi s'ha avaluat els efectes cel·lulars dels dues molècules amb activitat farmacològica, Daunorubicina i Criptolepina, des de dues perspectives:

- analitzant l'efecte citotòxic en el creixement cel·lular, estrès general, dany al DNA, i valorant la permeabilitat de la membrana plasmàtica als fàrmacs, per altra banda,
- analitzant la resposta transcripcional a diferents dosis de fàrmac i temps de tractament.

Efecte de la integritat de la membrana plasmàtica en la citotoxicitat de la Daunorubicina i la Criptolepina

Les soques de llevat de laboratori estàndards resulten insensibles a la Daunorubicina a concentracions inferiors a 100 μ M (Fig. R1), el que està d'acord amb dades publicades per a la citotoxicitat de diversos fàrmacs en el llevat (Kule et al., 1994). La soca *Δ erg6*, es caracteritza per una elevada alteració important de la composició de la membrana cel·lular (Sharma, 2006), és la més sensible a la Daunorubicina a concentracions baixes. Al voltant de 4 μ M s'observa una disminució dels creixement, en contraposició amb la soca salvatge o amb la membrana alterada (soca amb el gen *ISE2* alterat) (Fig. R1). L'acumulació intracel·lular de la Daunorubicina assoleix nivells gairebé del doble en les cèl·lules *Δ erg6* envers la soca salvatge o les cèl·lules *ISE2*, fet que indica una correlació entre la capacitat del fàrmac d'entrar en la cèl·lula depenent de la permeabilitat de la membrana, i els efectes cel·lulars (Fig. R3). El nivell basal detectat en les soques amb la membrana cel·lular íntegra podria ser suficient per desencadenar una resposta citotòxica lleu en les condicions més desfavorables. Aquestes dades suggereixen que el principal factor que protegeix la cèl·lula del llevat als intercalants del DNA és l'exclusió per part de la membrana cel·lular. Recolzant aquesta conclusió, s'ha observat prèviament (Marin et al., 2002) que

la capacitat d'expulsió del fàrmac de la cèl·lula realitzada pel sistema de multiresistència als fàrmacs o PDR, no influeix en la citotoxicitat de la Daunorubicina al llevat.

El tractament amb Criptolepina en la soca salvatge té efectes antiproliferatius, sobretot amb les dosis més elevades del rang testat. En soques amb la membrana alterada (tant *Δerg6* com *ISE2*) la sensibilitat al fàrmac incrementa (Fig. R1). En cèl·lules amb la membrana alterada (soca JN362A), el tractament amb Criptolepina inhibeix el creixement en un 50% quan s'assoleix una concentració del doble que per a les cèl·lules *Δerg6*. En ambdues soques, l'efecte citotòxic pot arribar a ser letal a l'augmentar la concentració de fàrmac. Per tant, la integritat de la membrana confereix resistència a la Criptolepina, al disminuir l'efecte citotòxic. Estudis en altres microorganismes han establert una relació entre la membrana o paret cel·lular i l'efecte citotòxic del fàrmac. Per exemple, en bacteris grampositius s'ha detectat una activitat major del fàrmac que en els bacteris gramnegatius. La microscòpia electrònica mostra que la susceptibilitat de *Staphylococcus aureus* a la Criptolepina ve provocada per la lisis cel·lular desencadenada per el fàrmac (Sawer et al., 2005).

La soca JN394, *ISE2* i amb el *RAD52* mutat (gen implicat en la recombinació homòloga) és el doble de sensible respecte la isogènica JN362a (Taula R1). Aquest fet, indica que el mecanisme d'acció de la Criptolepina pot estar relacionat amb el procés de reparació del dany al DNA per recombinació homòloga, mecanisme no implicat en la resistència a la Daunorubicina de cèl·lules creixent en glucosa (Taula R1). Diversos estudis han demostrat la forta interferència del fàrmac amb l'enzim topoisomerasa II, provocada per una estabilització del complex enzim-DNA, fet que promou talls al DNA (Bonjean et al., 1998; Dassonneville et al., 1999).

En resum, tant per la Daunorubicina com per la Criptolepina, la membrana plasmàtica confereix la primera resistència cel·lular. Al contrari que per la Daunorubicina, la resistència a la citotoxicitat de la Criptolepina en el llevat implica una major participació del mecanisme de reparació del dany al DNA.

Efecte inhibitori de la Daunorubicina en el metabolisme de la galactosa

L'efecte antiproliferatiu de la Daunorubicina està relacionat amb el metabolisme de la galactosa (Fig. R2). La citotoxicitat es triplica en la soca permeable i es duplica per a la que presenta la membrana modificada quan aquestes cèl·lules utilitzen la galactosa com a font de carboni en comptes de la glucosa (Taula R1). Aquest augment

de la sensibilitat en galactosa s'estudià a nivell transcripcional per a les cèl·lules *Δerg6*. Assajos *in vitro* han demostrat la capacitat discriminatòria de la Daunorubicina, d'interferir amb aquells factors de transcripció que presenten un solapament de la seqüència diana descrita pel fàrmac, amb les regions activadores del promotor (Upstream Activator Sequence o UAS), més concretament, amb la seqüència consens d'unió al DNA del factor de transcripció (Marin et al., 2002). Per demostrar l'efecte del fàrmac en un sistema *in vivo*, es va realitzar a partir d'un experiment dissenyat en el que s'assegurava la inducció de l'expressió i la traducció del factor Gal4p, el qual és l'activador transcripcional dels gens *GAL* (Lohr et al., 1995). Concentracions baixes (3μM) de Daunorubicina redueixen els nivells transcripcionals dels gens *GAL1*, *GAL3* i *GAL7*, els quals requereixen per activar-se de la unió de Gal4p als llocs UASgal presents en els seus promotors (Fig. R4) (Johnston and Carlson, 1992). L'efecte de la Daunorubicina sobre el genoma varia segons el grau d'inducció produït per la proteïna reguladora, ja que no tots els gens *GAL* responen amb el mateix ordre de magnitud d'activació en presència de galactosa. L'efecte del fàrmac en l'expressió de *GAL3* és menor, ja que pot ser degut a la baixa inducció d'aquest gen (quatre vegades) si es compara amb la forta inducció de *GAL1* o *GAL7* (un miler de vegades) en presència de Gal4p actiu (Fig. R4) (Johnston and Carlson, 1992).

Les soques de llevat analitzades tractades amb Criptolepina incrementen la sensibilitat al fàrmac quan utilitzen la galactosa com a font de carboni, excepte per la soca permeable. En galactosa, la soca *ISE2* augmenta la sensibilitat i té un perfil de creixement equiparable a la *Δerg6*. El fet de créixer en galactosa suggereix que la membrana plasmàtica incrementa la permeabilitat a la Criptolepina i les dues soques es comporten igual en presència del fàrmac, disminuint la resistència aportada per la membrana (Taula R1). La soca JN394, amb la membrana alterada, a més de mutant pel mecanisme de reparació del dany al DNA, presenta el perfil més sensible al fàrmac (Taula R1). Aquest fet enllaça amb observacions prèvies, en les quals la Criptolepina produiria lesions a l'àcid nucleic (Ansah et al., 2005).

A diferència de la Daunorubicina, l'efecte de la Criptolepina en el metabolisme de la galactosa no sembla *a priori* un efecte específic sobre la regulació a nivell genòmic, ja que els nivells transcripcionals dels gens *GAL3*, *GAL 7* i *GAL10* es mantenen en presència de l'activador Gal4p en presència del fàrmac (Fig. R4), no obstant, la sensibilitat al fàrmac sí que augmenta. Donat que l'ús de la galactosa com a

font de carboni desencadena en el llevat canvis fenotípics (Palecek et al., 2002), canvis relacionats amb el mecanisme de reparació per excisió de nucleòtids o NER (Bucheli et al., 2001), canvis en el transcriptoma, en gens reguladors del cicle cel·lular i implicats en l'estructura de la paret cel·lular, entre altres (Gasch et al., 2000; Lai et al., 2005), es suggereix la possibilitat que la galactosa estigui afavorint la permeabilitat al fàrmac Criptolepina.

Per tant, la Daunorubicina com a fàrmac intercalant altera el creixement, no només per la formació de lesions al DNA (lleugera activitat com s'ha vist anteriorment), sinó interferint i prevenint la unió dels factors de transcripció essencials al DNA, a causa d'una competició per la unió al DNA, sempre que la seqüència d'unió afï coincideixi, entre altres efectes. Un mecanisme que es proposa per la inhibició de la transcripció dirigida pel Gal4p en presència de la Daunorubicina, és la competició per part del fàrmac i del Gal4p per als dos llocs CpG en la UASgal (Liang et al., 1996; Marin et al., 2002), ja que la unió del fàrmac a la regió promotora podria disminuir l'afinitat del factor de transcripció per la seqüència solapant, degut als canvis estructurals de l'àcid nucleic els quals dificultarien la unió Gal4p-DNA. Un mecanisme semblant s'ha proposat en cèl·lules humanes en la inhibició de la transcripció dependent del Sp1 en presència d'antraciclina i bisantraciclina *in vivo* i *in vitro* (Martin et al., 1999; Villamarin et al., 2002), i per a la inhibició de la diferenciació miogènica en cultius cel·lulars per altres fàrmacs (Taylor et al., 1997).

El descobriment del fet que la Daunorubicina pot discriminar entre *UASs* a l'hora d'inhibir l'expressió dels gens transcrits per la RNA polimerasa II és prou rellevant, ja que reconeix regions de DNA de només 3 parells de bases de longitud. També s'ha descrit *in vivo*, en què algunes molècules presenten capacitat discriminatòria de seqüència, del DNA equiparable a la de la Daunorubicina, les poliamines Py-Im, s'uneixen a seqüències de 6 parells de bases adjacents a la caixa TATA i inhibeix l'expressió de gens regulats per la RNA polimerasa III (Gottesfeld et al., 1997), i la bisantraciclina WP631 (Mansilla et al., 2004).

Alteració del transcriptoma del llevat en resposta a la Daunorubicina i la Criptolepina

Saccharomyces cerevisiae respon als canvis ambientals amb un programa concret d'expressió gènica, alterant milers de gens per a cada condició (Gasch et al., 2001; Gasch et al., 2000; Hughes et al., 2000; Savoie et al., 2003). Tanmateix, hem

pogut definir una resposta transcripcional pròpia als agents intercalants Daunorubicina i Criptolepina (Resultats). Els canvis en el transcriptoma poden ser conseqüència d'una combinació dels 3 nivells d'acció potencials dels agents intercalants: el primer nivell d'interacció és la doble hèlix de DNA, donada la naturalesa d'intercalant al DNA. El segon nivell d'interacció és la disrupció del complex format proteïna-DNA, o d'altres interaccions de l'àcid nucleic (com estructures secundàries de DNA), que resulten de la unió fàrmac-DNA. Les proteïnes incloses en aquest punt susceptibles de l'acció dels fàrmacs, poden ser des de factors de transcripció, com s'ha descrit per la Daunorubicina (Marin et al., 2002), la topoisomerasa II, proteïnes associades a la cromatina, proteïnes implicades en la replicació, recombinació i reparació. Un altre efecte podria venir de l'estabilització d'estructures transitòries. El darrer nivell d'acció d'aquests fàrmacs intercalants podria ser l'efecte cel·lular pleiotròpic, com per exemple l'alteració d'estructures lipídiques.

Per tal d'avaluar la resposta transcripcional i els mecanismes d'acció de cada fàrmac, s'ha utilitzat la tecnologia dels microarrays de DNA, els quals contenen el genoma complet del *S.cerevisiae*. A partir del perfil transcripcional contrastat amb una tècnica quantitativa, i dels efectes diferencials en el creixement cel·lular, es proposen els possibles mecanismes d'acció propis per a cada fàrmac.

Avantatges de les diferents plataformes d'anàlisi global de la resposta transcripcional

La tecnologia dels microarrays aporta una eina alternativa per a l'avaluació de la citotoxicitat d'agents terapèutics en els organismes. Hem comprovat que, els microarrays de DNA són apropiats per estudiar els perfils d'expressió de la Daunorubicina i la Criptolepina en *Saccharomyces cerevisiae*. Tan els microarrays de cDNA, els quals tenen imprès la seqüència codificant del gen o ORF, com els microarrays d'oligonucleòtids aporten informació del mecanisme potencial d'acció per a cada fàrmac.

Els microarrays de cDNA constaven de pocs gens amb deposicions repetides, a més del sistema de directe de marcatge de les mostres, es va procedir a contrarestar el biaix dels fluorocrom i la variabilitat tècnica fent l'anomenat *dye swap* o marcatge de les mostres, amb els fluorocroms a l'inrevés. Tanmateix, això resultà en un nombre més reduït de quocients vàlids. Els microarrays d'oligonucleòtids constaven de la deposició

del genoma complert (mínim per duplicat), tret molt rellevant, ja que fa augmentar enormement la reproductibilitat de la tècnica. Un altre tret diferencial va ser el mètode de marcatge, es va utilitzar l'indirecte, el qual resultà més eficient que el directe ja que s'obtingué més quantitat de cDNA marcat. Però els nivells d'intensitat de la senyal per cada fluorocrom, i els valors d'expressió relativa van resultar proporcionalment menors que els obtinguts amb els microarrays de cDNA. Tal com s'ha observat en altres estudis abordats amb les dues plataformes, la qualitat de la resposta transcripcional varia lleugerament entre ambdues tècniques d'anàlisi global del transcriptoma (Iwahashi et al., 2007). Tot i que la quantificació de l'expressió mitjançant RT-PCR a temps real confirmen els resultats obtinguts d'ambdues plataformes, caldria detallar, que els coeficients de correlació corresponents als microarrays de cDNA són lleugerament superiors als dels microarrays d'oligonucleòtids. Podria estar relacionat amb el fet que els canvis d'expressió esperats pels gens de tractaments curts (dades relacionades amb els microarrays d'oligonucleòtids) són d'un factor de 2, i estaria en el llindar de detecció de la tècnica de qPCR.

Resposta global a la Daunorubicina i la Criptolepina: Efecte del temps i la concentració de tractament

La magnitud i la permanència dels canvis de l'expressió gènica varia positivament amb la severitat de l'estrès (Benton et al., 2006; DeRisi et al., 1997; Gasch et al., 2000). Diversos estudis han caracteritzat canvis en l'expressió gènica del llevat *Saccharomyces cerevisiae* al llarg del temps d'exposició a diversos estímuls; per exemple, les transicions ambientals provoquen una reacció immediata en el llevat, induint canvis de l'expressió gènica al cap de pocs minuts. Per altra banda, la resposta als tractaments amb fàrmacs s'observa havent transcorregut unes hores (Chu et al., 1998; Gasch et al., 2000; Schade et al., 2004; Travers et al., 2000). Semblantment al comportament donat en els darrers estudis, els patrons d'expressió genòmics varien depentment del temps en cultius sotmesos a la presència de la Daunorubicina (cf. Taules R2 i R8, Fig. R6) o la Criptolepina (cf. Taules R5 i R11, Fig R8). En la majoria de les condicions testades a curt termini, la resposta a 4 hores inclou i amplifica la resposta obtinguda a una hora de tractament. Al tractar-se de molècules antitumorals, un menor temps més curt de tractament implica una gran varietat de beneficis terapèutics, com pot ser una reducció dels efectes secundaris. Per ambdues molècules la capacitat d'inhibició

és superior al d'activació gènica. Els gens inhibits per a la Criptolepina representen el 60%, i per a la Daunorubicina aproximadament el 70%, respecte el total, amb un factor d'expressió diferencial inferior a -0.7 per la Criptolepina, i -1 per la Daunorubicina (representats en Log_2). Aquest fet concorda amb l'acció observada amb la Daunorubicina, que implica una disfunció de les proteïnes reguladores (Marin et al., 2002), i amb anàlisis comparatives de respostes genòmiques de cultius de *S.cerevisiae* sotmesos a diferents estressos, les quals han revelat que del 14% del total dels gens que s'alteren en situacions d'estrès (Gasch et al., 2000 Causton, 2001 #50), dos terços dels gens disminueixen els nivells de trànscrips i tan sols, aproximadament un terç augmenten els nivells d'expressió (Gasch and Werner-Washburne, 2002).

L'altra variable a comparar és la concentració del fàrmac, amb la qual s'han tractat els cultius. Estudis globals del genoma han mostrat la relació positiva entre un augment de la concentració de l'estímul amb la variació del transcriptoma de l'organisme, tant en llevats (Benton et al., 2006; DeRisi et al., 1997; Gasch et al., 2001; Palecek et al., 2002), com en cèl·lules de mamífer (Duan et al., 2007; Mansilla et al., 2003; Mansilla et al., 2007). Aquests canvis són dosi-depenent: a més concentració de fàrmac més quantitat de gens presenten alteracions en els seus nivells de trànscrip (Taula R8 i R11). Les cèl·lules tractades amb la dosi més elevada de Daunorubicina (IC40) presenten el doble de gens amb canvis en l'expressió, en relació amb els tractats amb la concentració IC10 (Taula R8). Un fet compartit per ambdues dosis és la presència d'una major proporció de gens reprimits, dels quals, un 7% mantenen l'expressió entre les dosis testades, a diferència del 13% dels gens comuns sobreexpressats (per un factor diferencial d'1.5, representats en Log_2). Un patró diferent és l'obtingut amb la Criptolepina; els canvis produïts en el transcriptoma majoritàriament es conserven entre les dosis analitzades. Aproximadament un 36% dels gens amb un canvi transcripcional inferior a -1.5, i un 45% dels gens activats amb un canvi superior a 1.5 (representat en Log_2) conserven el perfil d'expressió independentment de la dosi. Cèl·lules tractades amb la IC40 de Criptolepina varien l'expressió d'aproximadament un 40% menys que amb la IC40 de Daunorubicina. Aquest fet, pot indicar que la Criptolepina té un efecte menor en l'expressió gènica que la Daunorubicina.

Les respostes induïdes són específiques per a cadascun dels intercalants

Els antitumorals que s'estudien en aquesta tesi tenen en comú la propietat d'unir-se al DNA en regions riques en citosines tot i que la seqüència d'elevada afinitat és específica per a cada fàrmac, poden unir-se a seqüències diana degenerades. Aquest fet suggereix una certa semblança dels mecanismes d'acció. No obstant, tal com s'ha vist en el cas de la Daunorubicina, assaigs de β -galactosidasa amb diferents UAS mostren la capacitat de discriminar seqüències semblants a la seva diana, i només interferir amb les proteïnes reguladores quan el lloc d'unió d'alta afinitat del fàrmac coincideix amb el del factor de transcripció (Marin et al., 2002).

A més d'identificar els gens modulats en resposta a la Daunorubicina i a la Criptolepina, s'han cercat els gens que manifesten una resposta dosi-depenent (corresponent a tractaments prolongats) similar o oposada per ambdós fàrmacs. La resposta transcripcional per a cada fàrmac, només comparteix 4 gens amb un perfil dosi-depenent similar i 8 gens amb un perfil invers. Les respostes a tractaments curts (1-4 hores) amb Daunorubicina i Criptolepina coincideixen en l'alteració de 10 gens amb una tendència transcripcional similar i 4 gens que presenten comportaments inversos entre fàrmacs. Considerant que les respostes transcripcionals per a cada fàrmac no comparteixen els processos sobrerrepresentats (cf. Taules R18 i R19), i que el grup de gens regulats pels factors de transcripció comuns tenen patrons diferents segons el fàrmac, es pot afirmar que cada intercalant indueix una resposta específica en el llevat.

L'activitat antiproliferativa de la Criptolepina està governada per la resposta a estrès influenciada pel dany al DNA

L'avaluació de la resposta global del llevat en presència de la Criptolepina indica, a curt termini, l'efecte inhibitori dels gens codificants per enzims catalítics, entre els quals es troben oxidoreductases, i un grup de quatre quinases del metabolisme de les manoses (Taula R7). Entre els gens reprimits a 4 hores hi ha sis gens responsables de la localització mitocondrial. Juntament amb l'activació dels gens biosintètics (Taula R6) pot indicar l'afany de la cèl·lula per mantenir els nivells basals dels components cel·lulars. Els gens reprimits implicats en la localització mitocondrial inclouen dues xaperones mitocondrials requerides pel correcte plegament de proteïnes i tres transportadors de la membrana mitocondrial.

El tractament prolongat amb Criptolepina induïx una resposta a estrès (Taula R12). Al voltant del 60% dels gens activats estan sota el control dels principals factors de transcripció inductors de la resposta a condicions estressants en el llevat (Msn4/2p, Yap1p, Hsf1p) (Taula R19). Els efectes del tractament a llarg termini, també impliquen l'activació de la via de les pentoses fosfat. Aquesta ruta és important per la protecció del llevat enfront l'estrès oxidatiu (Slekar et al., 1996). Un altre grup són els gens codificants per a elements transposables, que en condicions normals es transcriuen assolint percentatges del 18% del total de mRNAs en medi ric YPD (Lopez and Baker, 2000). Els nivells de transcrit dels retrotransposons disminueixen en cèl·lules tractades amb el fàrmac. Tot i que l'expressió diferencial d'aquests gens pot reflectir una resposta cel·lular a l'estrès general, només s'ha detectat una variació en tractaments amb l'agent antitumoral Azinomicina B (Kelly et al., 2006). Recentment s'han realitzat estudis amb *S.cerevisiae* amb el procés de replicació del DNA alterat, i mostren com els elements Ty constitueixen un dels llocs diana per als trencaments de doble cadena del DNA (Lemoine et al., 2005). Tenint en compte que la Criptolepina és un intercalant i que les cèl·lules mutants pel *RAD52* són més sensibles al fàrmac (Fig. R1), la disminució de l'expressió dels elements transposables podria donar-se per les lesions induïdes al DNA per part del fàrmac.

Entre els gens inhibits es troba un grup de quatre gens amb una activitat molt determinada en el metabolisme dels sideròfors (Taula R13). Aquests gens implicats en el metabolisme del ferro es podrien relacionar hipotèticament amb l'activitat antiplasmodial descrita per la Criptolepina, deguda a la formació del complex Criptolepina-ferriporfirina (Van Miert et al., 2004; Wright et al., 2001). La comparació amb altres estudis transcripcionals d'ampli espectre, indiquen que l'efecte en el transcriptoma del llevat dirigit pels tractaments prolongats amb Criptolepina, és un patró típic d'estrès ja que s'apropa molt a la resposta obtinguda per una gran varietat d'estressos fisicoquímics: xoc tèrmic (amb i sense sorbitol), presència de H₂O₂, la Menadiona o vitamina K3, la Diamida (agent causant de ponts disulfur en les proteïnes de la superfície cel·lular), manca de nitrogen en un interval de 8 hores fins a 5 dies, l'estat de fase estacionària en medi ric, o bé, mutants dels principals factors de transcripció d'estrès (*ΔYAPI*, *ΔMSN2/4*) sotmesos a diversos estressos (Gasch et al., 2000). El conjunt de gens activats pertanyen al programa definit, com la resposta a l'estrès o ESR, la qual està formada per un conjunt de 300 gens que s'activen quan les cèl·lules passen de créixer en un medi òptim, a unes condicions estressants (Gasch et al.,

2000). El fet de catalogar la resposta al fàrmac dins el programa ESR i no trobar una resposta gènica específica de dany al DNA, pot ser degut a la baixa o gairebé nul·la relació entre els gens necessaris per a la supervivència als agents que lesionen el DNA i la inducció en els seus nivells de transcrit després d'estar exposats a aquests agents (Birrell et al., 2002). Altres experiments relacionats amb l'estructura, el silenciament i el dany al DNA presenten uns perfils molt semblants, per exemple, la resposta transcripcional produïda en una soca mutant pel gen *HTZI*, gen codificant per la histona H2AZ (Meneghini et al., 2003), soques amb el gen de la histona H4 delecionat (Wyrick et al., 1999), i cèl·lules mutants pel gen responsable del control del dany al DNA, *MEC1*, sotmeses a xoc tèrmic (Gasch et al., 2001).

La Criptolepina sembla que no té un efecte directe en la regulació de la transcripció, sinó més aviat, produeix un efecte indirecte en l'estat cel·lular general, i estaria actuant mitjançant un efecte pleiotròpic potencialment centrat en l'estructura de l'àcid nucleic, donat que el fàrmac és un agent intercalant al DNA i que interfereix amb la topoisomerasa II (Bonjean et al., 1998; Dassonneville et al., 1999). Aquest fet, s'enllaça amb els resultats obtinguts en l'assaig clonogènic, en el que s'observa un augment en la sensibilitat de cèl·lules tractades amb el gen *RAD52* delecionat (Taula R1).

L'activitat antiproliferativa de la Daunorubicina depèn de la interferència amb la regulació de l'expressió gènica

La resposta global del transcriptoma del llevat a la presència de la Daunorubicina es conserva parcialment en el temps (Figs. R7, R15 i R16). Els principals processos ontològics en els que s'agrupen els gens amb l'expressió dependent del fàrmac corresponen a la glicòlisi, via altament reprimida (Taula R4), la traducció i la biogènesis de constituents ribosomals, ambdós darrers processos per als gens sobreexpressats (Taula R3). Una altra categoria sobrerrepresentada entre els gens amb nivells incrementats de transcrit són els elements transposables (Taula R3). La categoria dels gens implicats en del metabolisme dels aminoàcids apareix com a ontologia sobrerrepresentada en la resposta inhibitoria entre 10 i 15 hores de tractament, tot i que alguns dels gens d'aquesta categoria ja disminueixen significativament els nivells de transcrit en la resposta primerenca (1-4 hores) (Figs. R15 i R16).

La regulació de l'expressió dels gens afectats per la Daunorubicina s'indica en la Taula R16. Dues de les proteïnes reguladores, Rpn4p i Gcn4p, presenten un enriquiment tant a curt com a llarg termini. Rpn4p s'encarrega de modular l'expressió de gens implicats en el sistema ubiquitina-proteosoma (Xie and Varshavsky, 2001). Estudis de *synthetic lethality* aporten indicis d'una relació entre el fàrmac Daunorubicina i la via de sumoilació de proteïnes (Huang et al., 2007). L'altre factor de transcripció enriquit al llarg del temps és l'activador transcripcional dels gens de la biosíntesi dels aminoàcids que s'indueix en condicions de deficiència d'aminoàcids. Gcn4p apareix entre els gens reprimits pel fàrmac, un patró transcripcional similar per aquests gens s'ha observat en cèl·lules tractades amb l'agent alquilant MMS (metil metano-sulfonat) (Natarajan et al., 2001). El tractament amb Daunorubicina, tot i reprimir gens implicats en la biosíntesi d'aminoàcids, no influeix, al menys directament, en la regulació dirigida pel factor general de la via biosintètica dels aminoàcids, ja que l'assaig fenotípic de la inducció de les condicions d'inanició mitjançant l'anàleg de la histidina 3-AT (3-aminotriazol), mostra com el creixement es recupera en presència de medi complementat amb l'histidina en cèl·lules tractades amb el fàrmac (Fig. R31).

Estudis previs han mostrat que la Daunorubicina és un intercalant al DNA amb la capacitat d'interferir amb la maquinària transcripcional, dificultant el correcte funcionament d'aquesta (Mansilla et al., 2004; Marin et al., 2002; Martin et al., 1999; Portugal et al., 2001). Així doncs, per tal de definir un dels potencials mecanismes d'acció, l'anàlisi es va centrar en la regulació dels gens reprimits pel fàrmac, ja que la Daunorubicina pot actuar impedit la funció activadora d'alguns factors de transcripció. Els factors més enriquits en la resposta repressora a la Daunorubicina s'agrupen en, reguladors de l'estat enèrgic-nutricional (Sok2p, Gcr1p i Gcr2p) i els implicats en la resposta a estrès (Msn2p, Msn4p, Yap1p i Pdr1p). En el primer grup s'hi troba Sok2p responsable de la via transductora de la senyal dependent d'AMP cíclic, la qual regula negativament la diferenciació pseudohifal, alhora estretament relacionada amb les condicions nutricionals en què es troben les cèl·lules (Pan and Heitman, 2000). En cèl·lules haploides la diferenciació pseudohifal acompanya a la resposta de les feromones, molècules que regulen el cicle cel·lular (Roberts et al., 2000). Cal destacar que una desregulació d'aquest factor es podria explicar pel solapament de la seqüència d'unió de la Daunorubicina (Chaires et al., 1990), amb la definida per a Sok2p (TGCAGNNA) (Harbison et al., 2004). Gcr1p i Gcr2p són els principals factors reguladors de l'expressió dels gens codificants pels enzims glicolítics (Chambers et al.,

1995). A més Gcr1p, se l'ha relacionat amb l'expressió de les proteïnes ribosomals (Lopez and Baker, 2000; Uemura and Jigami, 1992), i amb la transcripció d'elements transposables (Turkel et al., 1997).

Desregulació del metabolisme dels carbohidrats provocada per la Daunorubicina. Inhibició de l'expressió dels gens glicolítics

Saccharomyces cerevisiae activa la ruta glicolítica en presència d'una font fermentable com la glucosa. Els gens codificants per enzims glicolítics pertanyen a un dels conjunts de gens que tenen associada una de les taxa de transcripció més altes, alhora que cadascun dels trànscrips són dels més abundants en el llevat (Lopez and Baker, 2000; Velculescu et al., 1997). El principal control dels enzims glicolítics es realitza a nivell transcripcional, els nivells de mRNA dels gens corresponents depenen de la taxa transcripcional i de l'estabilitat del mRNA (Gancedo, 1992). Aquesta regulació es dona mitjançant la unió del factor de transcripció amb la seqüència promotora o *upstream activating sequence* (UAS) de cada gen (Lopez and Baker, 2000). Els elements UAS per als gens glicolítics estan formats per llocs d'unió específics i pròxims entre Gcr1p i Rap1p (Bitter et al., 1991). Gcr1p s'uneix al DNA en llocs CT, GGCTTCCWC (Matys et al., 2003), no obstant la presència de Rap1p recluta i dirigeix el factor Gcr1p als UAS dels gens glicolítics (Drazinic et al., 1996). El complex Rap1p-Gcr1p està implicat en la regulació de l'expressió dels gens de proteïnes ribosomals (Lopez and Baker, 2000), tot i que el mecanisme pel qual actua Gcr1p no és igual a com ho fa pels gens d'enzims glicolítics (Tornow et al., 1993; Zeng et al., 1997). El manteniment del control transcripcional dels gens implicats en la glucòlisi, s'aconsegueix amb la unió del factor auxiliar Gcr2p a Gcr1p (Deminoff and Santangelo, 2001; Uemura and Fraenkel, 1990).

L'estudi quantitatiu dels gens implicats en la via glicolítica mostra una disminució significativa dels trànscrips en presència del fàrmac, superior al doble per *GPM1*, *TDH(1-3)*, *FBA1*, *PGK1* i *CDC19*. Aquesta repressió no s'observa per al gen de la proteïna ribosomal *RPS28A*, indicant un desacoblament entre aquests dos mecanismes. La resposta transcripcional obtinguda per la Daunorubicina, al comparar-la envers altres experiments que analitzen l'alteració del transcriptoma del llevat enfront diversos estressos fisicoquímics, no s'ha detectat cap comportament similar. Tanmateix, existeix un cas diferent en el qual el patró és semblant, aquest correspon a l'estudi

realitzat per a soques amb l'expressió d'un gen suprimida per un promotor induïble, en particular, per les soques *knockout* dels gens codificants per proteïnes implicades en la síntesi de ribosomes (Mnaimneh et al., 2004).

L'adaptació del llevat enfront diverses condicions subòptimes o estressants, recau en una inhibició de la síntesi de proteïnes, una repressió dels gens requerits per la síntesi i el processament dels ribosomes, i dels gens transcripcionalment dependents de la RNA polimerasa I i III (Gasch and Werner-Washburne, 2002). La reducció de la síntesi d'aquests trànscrips i dels seus productes pot contribuir a conservar l'energia mentre les cèl·lules s'adapten a la nova condició (Warner, 1999). Aquesta resposta va acompanyada d'una inducció del metabolisme dels carbohidrats per tal d'abastir a la cèl·lula de reserves energètiques. Estudis han mostrat una coordinació entre els grups de gens induïts (constituents ribosomals i elements transposables) amb el conjunt de gens glicolítics reprimits (Lopez and Baker, 2000). L'element comú entre aquests processos és el factor de transcripció Gcr1p, ja que la inducció de la transcripció dels tres grups de gens és dependent de la presència de la proteïna reguladora (Lopez and Baker, 2000). Tal com s'ha citat en apartats previs, la Daunorubicina indueix el desacoblament entre els gens glicolítics i els ribosomals, a més de l'enriquiment de Gcr1p i Gcr2p en la resposta repressora, es suggereix que el mecanisme d'acció del fàrmac està mediat per la interferència en la funcionalitat del complex Gcr1p/Gcr2p, ja que el tret diferenciador a nivell de l'expressió gènica entre els gens ribosomals i els glicolítics ve donat per la proteïna reguladora Gcr2p (Sasaki and Uemura, 2005).

Aquests resultats mostren que la capacitat antiproliferativa de la Daunorubicina podria resultar de les propietats inhibidores derivades de la desregulació de la maquinària activadora, a diferència de la Criptolepina que podria estar inhibint el creixement com a conseqüència de lesions produïdes en l'àcid nucleic. Cal remarcar que la capacitat de la Daunorubicina d'inhibir la transcripció dependent dels factors de transcripció, pot estar determinada pels següents paràmetres:

- i. La posició del lloc d'unió del factor de transcripció respecte l'inici de la transcripció.
- ii. La seqüència concreta del lloc d'unió en el gen. Tot i que s'hagi descrit una seqüència consens pel factor de transcripció, aquest té la capacitat de reconèixer dianes degenerades. L'efectivitat de la Daunorubicina d'interrompre la funció reguladora del factor de transcripció depèn de la presència en els llocs d'unió al promotor, la seqüència diana del fàrmac (Marin et al., 2002). La inhibició podria provindre d'una

competència per la regió al DNA i com a resultat un desplaçament del factor, la disfunció o bé, degut a la torsió en el DNA induïda per l'intercalant, una reducció de l'afinitat del factor per la regió promotora.

Evidentment, els antitumorals s'han desenvolupat per actuar en cèl·lules humanes, però la identificació de dianes específiques pels fàrmacs per tal de millorar l'eficiència en cultius de cèl·lules de mamífer és complexa. El *Saccharomyces cerevisiae* és un bon organisme model, tanmateix, s'ha de considerar el fet que des d'un punt de vista genòmic les línees cel·lulars cancerígenes són diferents entre elles i de les cèl·lules pròpiament dels tumors. A més, el llevat en el seu cicle vital existeix com a organisme haploide, fet avantatjós ja que l'efecte a nivell genòmic té una representació fenotípica directa.

L'efecte de la Daunorubicina depenent del temps i de la concentració en el transcriptoma concorda amb l'observat en cèl·lules humanes, així doncs, no és peculiar del llevat si no que en les cèl·lules tumorals també s'esdevé (Duan et al., 2007; Mansilla et al., 2003). Tal i com es mostra en la Taula R4 en concordància amb la Fig. R32, el mecanisme fonamental d'acció de la Daunorubicina és la inhibició de la regulació transcripcional del metabolisme dels sucres. Tot i que avui en dia no s'ha descobert l'homòleg de Gcr1p o Gcr2p en humans, s'han caracteritzat en mamífer elements del DNA de resposta a la glucosa, els quals presenten dues seqüències solapants amb la diana del fàrmac, 5'-CACGTG-3' separades per cinc nucleòtids, on s'uneix el factor de transcripció anomenat USF/MLTF (Foufelle et al., 1998). Estudis molt recents han descrit una relació entre la resposta a la Daunorubicina, l'estat oxidatiu i els nivells de glucosa en cèl·lules eucariotes superiors (Cao et al., 2007). Des de fa pocs anys, s'està intentant usar la via glicolítica per a aplicacions terapèutiques i com a diana potencial per als agents antitumorals (Pelicano et al., 2006; Xu et al., 2005). Sabent que les cèl·lules tumorals presenten la glicòlisis elevada (Shaw, 2006), aquesta aproximació planteja un nou camp d'estudi de les dianes potencials dels fàrmacs antitumorals, i beneficia el desenvolupament de nous agents anticancerígens amb mecanismes d'acció alternatius.

Conclusions

I. La integritat de la membrana plasmàtica confereix resistència als intercalants Criptolepina i Daunorubicina en *Saccharomyces cerevisiae*. La soca $\Delta erg6$ és sensible a baixes concentracions dels fàrmacs. La concentració necessària de Daunorubicina per assolir el 50% d'inhibició del creixement en la $\Delta erg6$, és menor que per a la Criptolepina.

II. L'efecte de la Criptolepina està relacionat amb el mecanisme de reparació de lesions al DNA per recombinació homòloga. La soca doble mutant JN394 (*ISE2* $\Delta rad52$) és més sensible que la isogènica JN362A (*ISE2*).

III. Els fenotips induïts per la Criptolepina i la Daunorubicina són consistents amb les seves preferències de seqüència d'unió al DNA. La resposta transcripcional del llevat als intercalants, depèn positivament de la variable temps per ambdós fàrmacs, i de la concentració per la Daunorubicina

IV. L'especificitat de la seqüència d'unió al DNA dels fàrmacs intercalants dirigeix diferents respostes del transcriptoma del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. La Daunorubicina pot competir amb els factors de transcripció per la seva seqüència de reconeixement i d'unió al DNA si es solapen amb el lloc diana del fàrmac. Aquest efecte no s'aprecia per l'intercalant Criptolepina.

V. El metabolisme de la galactosa en el llevat s'inhibeix en presència de baixes concentracions de Daunorubicina, la qual interfereix en la correcta regulació dels gens de la família *GAL*.

VI. L'activitat antiproliferativa de la Criptolepina està governada per la resposta a estrès. Aquesta resposta es desenvolupa després d'algunes hores de tractament. L'efecte induït pel fàrmac en el llevat sembla ser el dany al DNA, enlloc de l'alteració de la regulació de l'expressió gènica.

VII. La Daunorubicina inhibeix específicament un conjunt de gens directament relacionats amb la glicòlisi. El mecanisme d'acció postulat per la Daunorubicina és la disfunció dels factors de transcripció que regulen la via metabòlica, concretament el complex activador Gcr1p-Gcr2p.

VIII. El llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a sistema estudi per a l'anàlisi d'agents terapèutics, esdevé una aproximació més manejable que l'ús de models animals o de cèl·lules humanes en cultiu. L'ús del *Saccharomyces cerevisiae* pot facilitar el desenvolupament de nous fàrmacs anticancerígens i l'anàlisi dels seus mecanismes d'acció.