

PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR PROTEINAS QUINASAS EN LOS FENÓMENOS DE QUIMIO Y RADIO RESISTENCIA

Proyecto presentado por la Unidad de Oncología Molecular del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB) de La Universidad de Castilla la Mancha a la fundación “Leticia Castillejo Castillo”

Investigador Principal:

Dr. Ricardo Sánchez Prieto

Equipo investigador:

Dr. Juan Llopis Borrás

Dr. José Javier García Ramírez

Dra. María José Ruiz Hidalgo

Dra. Raquel Villuendas

Dr. Manuel Atienzar

Dra. María Victoria Villas Sánchez

Dr. Juan Carlos Gómez

Dra. Carmen Alonso

El presente proyecto será el núcleo central de la investigación subvencionada por la fundación Leticia Castillejo Castillo, si bien estos fondos podrán apoyar de forma minoritaria otros proyectos ya en marcha en la unidad de oncología molecular del CRIB tales como estudios sobre los mecanismos de transformación y quimio /radio Sensibilidad mediados por el gen E1a, detección de oncogenes virales en patología humana.

Antecedentes y estado actual

En la actualidad el cáncer es, en cualquiera de sus formas, la tercera causa de muerte en los países industrializados. En España la mortalidad por patologías oncológicas (datos del año 2000) se sitúa en un 31% para varones y en mujeres del 21%. En la comunidad de Castilla la Mancha el número de defunciones en el año 2000 fue, contabilizando ambos sexos, de 14272 entre las cinco provincias, de las cuales 3793 fueron debidas a tumores malignos, lo que supone 26% del total de defunciones. En términos relativos la tasa de muerte por 100000 habitantes varones, respecto de la población estándar europea (TasaE) osciló entre los 215 de Ciudad Real hasta los 198 de Guadalajara, valores estos similares, e incluso superiores, como en el caso de Albacete con 213, a las enfermedades cardiovasculares. En lo referente a las mujeres la tasa europea en la Comunidad de Castilla la Mancha es aproximadamente de la mitad respecto a los varones de la misma comunidad y oscila entre los 106 de Toledo hasta los 93 de Cuenca. Por patologías, destacan en varón los cánceres de pulmón con 603

defunciones y tan solo 54 en mujeres. En el caso de los carcinomas mamarios se invierte la proporción con más de 230 defunciones en mujeres y en hombres sólo 3. En el caso del colon se contabilizaron 189 defunciones en varones y 88 en mujeres, lo que supone un considerable porcentaje de las defunciones debidas a patología tumoral y a diferencia de otras patologías como tumores ginecológicos, próstata o mama, se manifiesta en ambos sexos. Mención especial merece el grupo formado por tumores de cabeza y cuello que muestra una amplia incidencia en la población de ambos sexos de Castilla La Mancha (Para una información más detallada visitar <http://193.146.50.130/mortal/mortal2000/entradaweb.htm>) Estos datos, obtenidos de la última estadística de mortalidad presentada por el Centro Nacional de Epidemiología del Inst. De Salud Carlos III, indican la importancia en el ámbito regional y nacional de la patología tumoral.

Hoy en día disponemos de tres herramientas básicas en la lucha contra el cáncer, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Desgraciadamente, los nuevos abordajes como la terapia génica o la inmunoterapia, se encuentran todavía en una fase experimental, aunque en algunos casos con resultados realmente esperanzadores. De estos tres abordajes terapéuticos, la cirugía es la herramienta más efectiva, sí bien, y por razones obvias, no es siempre practicable. Los fenómenos de resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia siguen siendo uno de los factores limitantes en el tratamiento del cáncer. Desde mediados de los años 80 se empezó a estudiar el papel de determinados genes en la respuesta a la quimio y radioterapia. Así, esta ampliamente establecido que genes como Abl (Kharbanda et al., 1998), DNA-PK (Smith & Jackson, 1999) o p53 (Lakin & Jackson, 1999) entre otros, son claves en la respuesta celular a la quimio y radioterapia. De forma paralela, comenzaron los estudios de transducción de señales, entendiéndose como tal el conjunto de fenómenos bioquímicos que ocurren en una célula desde que llega una señal hasta que se inicia un determinado programa de expresión génica. Uno de los mecanismos clásicos de transducción de señales es el mediado por el grupo de las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases o MAPK). Este grupo de proteínas pertenecen a las serin-treonin quinasas dirigidas por prolina. Todas ellas son activadas por una quinasa de MAPK (MAPKK) que fosforila a las MAPK en treonina y tirosina.

De las vías implicadas en la respuesta al estrés genotóxico impuesto por la quimio y la radioterapia podemos distinguir varios grupos:

ERK1 y ERK2. Este fue el primer grupo de MAPK identificado. Tradicionalmente se ha asociado a proliferación, siendo el mecanismo subyacente a muchos oncogenes como ras. Existen trabajos recientes que demuestran su posible activación por quimioterapia, su papel en la respuesta celular a la quimioterapia todavía no está claramente definido (Bacus et al., 2001; Persons et al., 1999; Wang et al., 2000a).

SAPK (Stress Activated Protein Kinases). Este grupo, perteneciente a la superfamilia de las MAPK esta compuesto de dos familias, JNK y p38 MAPK, claramente implicadas en el estrés genotóxico y, de forma muy clara, el condicionado por cisplatino y radiación. En este sentido, se ha demostrado cómo la familia de p38 es capaz de controlar la fosforilación de p53, p73 y CDC25 25 (Sanchez-Perez et al., 1998; Sánchez-Perez & Perona, 1999; Sánchez-Prieto et al., 2000; Sanchez-Prieto et al., 2002; Wang et al., 2000b).

ERK5. Esta MAPK es uno de los miembros más recientes de la familia y fue identificado en 1995. Presenta una alta homología con ERK1/2 pero además presenta un dominio característico en el C-Terminal de la proteína que sugiere implicaciones en citoesqueleto (Zhou et al., 1995). Recientes evidencias han demostrado que esta MAPK es activada por radicales libre (Abbe et al., 1996), lo que sugiere que esta proteína puede estar implicada en fenómenos de quimio y radio, resistencia, ya que tanto la quimio como la radio liberan radicales libres. Pero, además esta MAPK esta implicada en el control de proteínas como c-Myc o Cot, con un contrastado potencial oncogénico (English JM et al., 1998, Chiariello et al., 2000), así como en el control de la proliferación. Recientemente se han descrito algún indicio de su posible papel como marcador en cáncer de próstata (Mehta et al., 2003) así como activación constitutiva en líneas derivadas de cáncer de mama (Esparis-Ogando et al., 2002). En resumen existen evidencias que hacen considerar a la ruta de Erk5 como una seria candidata a participar en los fenómenos de resistencia a los agentes antitumorales.

PI3K-AKT. Esta ruta de transducción de señales se asocia a la supervivencia y, a diferencia de las anteriores, no pertenece a la súperfamilia de MAPK. Su activación está mediada por la fosforilación de lípidos. En este caso, la cascada de fosforilación está mediada por P110 (subunidad catalítica de PI3K) que implica la fosforilación de lípidos que, a su vez, provoca la activación de PDK1 y, por último, la activación de PKB/AKT mediante la fosforilación en la treonina 308. La activación completa requiere la fosforilación en otro residuo, serina 473, controlada por una proteína desconocida llamada PDK2. Se empieza a establecer un posible papel para esta vía de transducción de señales en la respuesta a la quimio y radioterapia, en diferentes tumores como ovario o pulmón (Asselin et al., 2001; Brognard et al., 2001; Hayakawa et al., 2000; Mitsuuchi et al., 2000; Page et al., 2000). Además, el activador natural de AKT, la PI3K, está igualmente implicado en la respuesta a la quimio y radioterapia. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado cómo la inhibición de esta ruta es clave para el efecto sensibilizante de genes como el E1a de adenovirus (Viniestra et al., 2002)

Uno de los puntos clave para los efectos biológicos de estas rutas de señalización es su localización. Así, las mayoría de la MAPK necesitan ser traslocadas al núcleo para que puedan ejercer su efecto biológico mediante la fosforilación de los diferentes factores de transcripción. En el caso de Akt es necesario la translocación a membrana citoplasmática para su correcta activación. Los estudios de localización de estas proteínas pueden ser claves para poder entender su funcionalidad y su posible papel en cáncer.

Para el estudio del papel de estas rutas de transmisión de señales disponemos de diferentes tipos de abordaje tales como el uso de inhibidores químicos, la generación de dominantes negativos de activadores superiores (upstream), así como formas inactivas de las quinasas en estudio y, más recientemente, de las técnicas basadas en RNA de interferencia. Esta técnica, pese a una gran complejidad metodológica permite el bloqueo exclusivo y casi total de una proteína en estudio. En el apartado de metodología se dan más detalles sobre esta novedosa técnica. Este tipo de abordajes se puede aplicar tanto a la quinasa en estudio como al activador. Así, en el caso de p38 MAPK se puede trabajar sobre la quinasa o sobre cualquiera de los activadores por encima (MKK6 o MKK3). Además, en la actualidad disponemos de inhibidores químicos selectivos que permiten bloquear la activación de rutas determinadas, por ejemplo, SB203580 inhibe específicamente a p38 MAPK y LY 90204 inhibe la activación de PI3K-AKT. Uno de los puntos críticos para los efectos biológicos de estas rutas de señalización es su localización. Así, las mayoría de la MAPK necesitan ser traslocadas al núcleo para que puedan ejercer su efecto biológico, en lo que para la ruta de PI3K/Akt es necesario la translocación a membrana citoplasmática para su correcta activación. Los estudios de localización de estas proteínas pueden ser claves para poder entender su funcionalidad y su posible papel en cáncer. En este sentido planeamos la creación de formas marcadas con proteína verde fluorescente (GFP), que nos permita evaluar *in Vivo* e *in Vitro* el papel de la localización de MAPK y Akt en la respuesta a antitumorales

El presente proyecto pretende abarcar un espectro de tratamientos oncológicos que incluyen la quimioterapia convencional (cisplatino), la radioterapia y las nuevas drogas de diseño (STI571). Estos tres tratamientos han demostrado una alta efectividad y los fenómenos de resistencia suponen un serio problema.

El cisplatino es uno de los quimioterápicos más usados en terapia oncológica. La diana básica del cisplatino es el ADN mediante la generación de aductos inter e intracatenarios. El mecanismo fundamental de muerte celular asociado a cisplatino es la apoptosis, sí bien no es el único mecanismo (Gonzalez et al., 2001). En la actualidad se conocen ya algunos mecanismos de resistencia al cisplatino y se sigue afanosamente la búsqueda de marcadores de resistencia a este fármaco (Perez, 1998; Zlatanova et al., 1998). Por otro lado, es importante destacar la existencia de un isómero, el transplatino, con idéntica composición pero sin efecto terapéutico (Boudvillain et al., 1995), un excelente control, ya que permite discernir claramente cualquier efecto inespecífico. No obstante, aunque existe abundante información sobre distintos sistemas celulares (Sanchez-Perez & Perona, 1999; Sanchez-Prieto et al., 2000). no se ha demostrado correlación clínica entre la respuesta y la actividad de SAPK o AKT. En este sentido nuestro grupo ya tiene evidencias del papel de p38MAPK en la respuesta a cisplatino en modelos experimentales de cabeza y Cuello (Hernández Iosa et al., en revisión en Oncogene). Es importante señalar que c-ABL ha sido relacionada con diferentes rutas de transducción de señales, especialmente la de las SAPK. (Stress Activated Protein Kinases) (Kharbanda et al., 1995a; Kharbanda et al.,

1995b). Más aun, el cisplatino es considerado como un ejemplo típico de droga que requiere el concurso de c-ABL para la activación de las SAPK (Gong et al., 1999; Kharbanda et al., 1995b; Pandey et al., 1996). No obstante, existen otras moléculas, como ASK1, que igualmente pueden mediar la activación de las SAPK (Chen et al., 1999). En el caso de la vía AKT, los activadores upstream están mucho más definidos, siendo PI3K y la posterior activación de PDK1 y el desconocido PDK2 los que median la activación de AKT (Chan & Tsichlis, 2001). Es llamativo el dato reciente que conecta las vías de p38 MAPK y AKT por un sustrato de p38 como MAPKAPK 2 (Rane et al., 2001).

La radiación ionizante es sin duda una de las terapias más efectivas en oncología. Al igual que en el caso la anterior la diana clave es la molécula de DNA. No obstante los fenómenos de resistencia son relativamente altos. Existen causas ya establecidas desde un punto radiobiológico (radioresistencia intrínseca, hipoxia, tiempo de duplicación...) que pueden explicar por que algunos tumores como los glioblastomas son extremadamente resistentes. No obstante desde hace tiempo genes como p53, c-Abl o ATM parecen determinantes de la respuesta celular a la radioterapia. Estos genes en muchos casos pueden ser activadores o efectores de las rutas mediadas por SAPK o AKT, que como ya se ha indicado son activados por radiación ionizante.

El último de los tratamientos antitumorales que se pretende estudiar es el STI571 (Druker et al., 1996, Deininger et al., 1997). Este inhibidor ha supuesto uno de los mayores avances en el tratamiento de esta enfermedad con unos resultados espectaculares (Goldman & Melo, 2001). Este fármaco es una droga diseñada para bloquear específicamente la quinasa de Abelson (c-ABL) que junto con BCR genera la proteína quimérica BCR/ABI. No obstante ya existen casos de resistencia a este fármaco asociados a mutaciones en el dominio quinasa de Abl así como sobreexpresión de y se empieza a dar un papel clave para las rutas gobernada por AKT y ERK (Klejman et al., 2002; Yu et al., 2002). En la actualidad nuestro grupo dispone ya de un acuerdo (Material transfer Agreement) con la compañía Novartis, lo que garantiza el abastecimiento del compuesto, así como de líneas celulares de LMC resistente a STI571 por cocultivo.

Un aspecto clave de este proyecto es el desarrollo de sistemas de animales de experimentación. Entre las distintas posibilidades nos planteamos la generación de ratones transgénicos con formas hiperactivadas, sin actividad quinasa (KD) o dominantes negativos de aquellas rutas de señalización que a lo largo del estudio presente una mayor implicación en la respuesta a tratamientos antitumorales. En la actualidad existen ratones nulos (KO) para la expresión de Akt1, p38 MAPK, JNK y ERK1/2 y ERK5. Interesantemente no se ha visto que la ausencia de estos genes genere un patrón correspondiente a una patología oncológica. Así en el caso de p38 MAPK se vieron defectos en placenta (Adams et al., 2000), en el caso de Akt retardo en el crecimiento y fallos en el sistema inmune (Cho et al., 2001; Chen et al 2001), en el caso de Erk5 los ratones no son viables ya que la ausencia de esta quinasa no permite el normal desarrollo del animal (letal embrionario) (Regan et al, 2002). Este dato nos hace presuponer que las rutas que vamos a estudiar no tienen un papel como supresores de tumores. No obstante, no esta explorada la posibilidad de que se comporten como oncogenes. Por tanto, las formas hiperactivas pueden generar fenotipos que se correspondan a determinadas patología. El planteamiento inicial sería usar transgénicos con expresión de estas quinasas modificadas en piel, bajo el control de un promotor específico de piel, como el promotor de determinadas keratinas (para más detalles ver sección metodología). Estos animales nos permitirían evaluar el papel *In Vivo* de cada ruta, generación de nuevas líneas celulares y establecer su papel en la génesis y desarrollo del cáncer.

Otro de los apartados claves en este proyecto es el abordaje genómico que planteamos. Como es conocido las técnicas de genómica permiten una búsqueda rápida y fiable de genes cuya expresión es diferencial en función de un estímulo a tratamiento. Este abordaje parece ser tremendamente exitoso en líneas celulares en cultivo, por este motivo planteamos usar los cultivos como herramientas para este abordaje genómico. las líneas celulares a estudiar serán aquellas en donde las vías de SAPK y AKT presenten una clara inducción y además dichas vías sean responsables de fenómenos de resistencia o sensibilidad por hiperactivación o bloqueo. Como control se llevara una línea resistente al fármaco mediante cocultivo con la droga. En la actualidad ya disponemos de algunas de estas líneas. Por tanto el panel final de líneas a estudiar constará de la línea celular que no ha sido expuesta al tratamiento, la línea resistente y aquellas en la que hemos bloqueado/hiperactivado específicamente

una determinada vía de señalización. Este abordaje nos permitirá por un lado detectar aquellos genes expresados en células resistentes comparados las células normales y resistentes. Además, podremos saber de estos genes cuales dependen de las rutas de señalización en estudio al compararlos con las células modificadas genéticamente. Los hallazgos obtenidos mediante este abordaje nos permitirán detectar en biopsia el potencial papel a nivel diagnóstico y pronóstico de estos nuevos marcadores, así como estudiar más detalle su papel biológico.

Desde el punto de vista clínico podemos distinguir dos grandes grupos de tumores a evaluar en este estudio.

Tumores sólidos:

Se estudiarán tumores sólidos en cuyo tratamiento suela participar el cisplatino y radiación, como aquellos de cabeza y cuello, cervix, ovario y pulmón. Las rutas de transducción de señales antes descritas están implicadas en la génesis de tumores. De este modo, la disfunción de la vía de ERK1/2 se ha descrito en diferentes tumores e incluso se han propuesto alternativas terapéuticas en carcinoma de colon (Sebolt-Leopold et al., 1999). Igualmente existen gran cantidad de tumores donde la alteración de la vía de AKT se ve hiperactivada por la alteración (delección) en gen supresor de tumores pTEN/PTEN, que es la fosfatasa de fosfolípidos que activan a AKT (Simpson & Parsons, 2001; Stambolic et al., 1998). Recientemente se ha demostrado la participación de la vía de p38 MAPK en la génesis de tumores, si bien en este caso parece ser mediado por la fosfatasa específica PPMD1. Conviene destacar que en la mayoría de los casos este tipo de patologías son tratadas de forma concomitante con radioterapia, motivo por el cual se estudiará en los distintos modelos celulares la activación de SAPK y AKT por radioterapia al objeto de poder establecer una mejor correlación clínica. En la actualidad ya existen evidencias experimentales de la implicación de estas vías en la respuesta a radioterapia (Brognard et al., 2001; Wang et al., 2000b). Para los estudios básicos utilizaremos diversos modelos celulares representativos de las distintas patologías. En el mercado existen gran cantidad de líneas celulares derivadas de tumores de cabeza y cuello (HN19, HN30), pulmón (Hop62, DV90) o cervix (Hela, SUKT1-B) donde pretendemos evaluar la activación de las diferentes rutas por los diferentes tratamientos. En lo referente a los pacientes pretendemos, estudiar de forma prospectiva series de tumores que sean sometidos a quimioterapia con cisplatino y/o radioterapia. Esta observación nos permitirá establecer una correlación, si existe, entre el nivel basal de actividad y los distintos tipos y grados histológicos así como con la respuesta al tratamiento. Para ello se determinarán, mediante inmunohistoquímica o Western blot, los niveles de actividad basal de cada una de la quinasas en las biopsias de los casos de nuevo diagnóstico, siempre antes de cualquier tratamiento de quimio o radioterapia y nuevamente en todos los casos en los que sea factible disponer de muestras tras los tratamientos.

Neoplasias del sistema linfohemático, representadas por la Leucemia Mieloide Crónica y Linfoblástica Aguda:

En este sentido el STI571 ha sido diseñado para estas patologías ya que la expresión de la proteína quimérica Bcr/Abl, tanto en su forma de 210 como de 190 Kd, es la diana del farmaco. Para ello usaremos modelos celulares derivadas de enfermos de Leucemia Mieloide Crónica o linfoblástica aguda (k562, KCL22, LAMA-84) así como modelos con expresión exógena de la proteína quimérica Bcr/Abl (baf 3 Mo7 o 32D). El primer grupo nos permitirá establecer la activación y la respuesta en lo que el segundo nos permitiría una comparación ya que disponemos del mismo fondo genético con y sin expresión de Bcr/abl. En lo referente a los pacientes este grupo sólo será analizado para la respuesta a STI571. Con objeto de poder correlacionar el status de las diferentes rutas de transducción con la respuesta a tratamiento o el estadio de la enfermedad, se obtendrán PBLs y granulocitos procedentes de controles sanos y pacientes representativos de cada estadio de la enfermedad (nuevos diagnósticos, fase crónica, fase acelerada, crisis blástica, respuestas hematológicas, distintas respuestas citogenéticas,...). Una vez aislados mediante gradiente de densidad, se someterán a lisis en tampón de quinasa y ensayos de western blot con fosfo anticuerpos.

En todos los casos se asegurará la confidencialidad de los pacientes conforme a la normativa vigente.

En resumen, el presente proyecto pretende sentar las bases, a partir de los datos obtenidos en modelos básicos,

de la correlación de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPK y AKT con la respuesta a una serie de tratamientos que representan la mayoría de los actuales tratamientos contra el cáncer (Cisplatino, radiación ionizante y STI571), permitiendo evaluar su valor como posibles marcadores de respuesta. Además pretendemos buscar nuevos marcadores asociados a las vías de señalización mediante abordajes genómicos y la generación de nuevos modelos animales de experimentación. Como se indica más adelante en el apartado sobre el equipo investigador, la participación en este proyecto de expertos investigadores básicos, junto con especialistas en oncología radioterápica, médica y anatomía patológica, con amplia experiencia profesional, garantizan la aplicación de los posibles resultados a la práctica clínica en un futuro.

Bibliografía más relevante

- Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. (2000). *Mol Cell*;6, :109-16
- Astoul, E., Watton, S. & Cantrell, D. (1999). *J Cell Biol*, 145, 1511-20.
- Bacus, S.S., Gudkov, A.V., Lowe, M., Lyass, L., Yung, Y., Komarov, A.P., Keyomarsi, K., Yarden, Y. & Seger, R. (2001). *Oncogene*, 20, 147-55.
- Brognard, J., Clark, A.S., Ni, Y. & Dennis, P.A. (2001). *Cancer Res*, 61, 3986-97.
- Chan, T.O. & Tschlis, P.N. (2001). *Sci STKE*, 2001, E1.
- Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. & Tsuruo, T. (1999). *Oncogene*, 18, 173-80.
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Wenig, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., and Hay, N. (2001) *Genes Dev.* 15, 2203-2208
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M. J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 38349-38352
- Deininger, M.W., Goldman, J.M., Lydon, N. & Melo, J.V. (1997). *Blood*, 90, 3691-8.
- Deininger, M.W., Goldman, J.M. & Melo, J.V. (2000). *Blood*, 96, 3343-56.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J. & Lydon, N.B. (1996). *Nat Med*, 2, 561-6.
- Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W.G., Jr., Levrero, M. & Wang, J.Y. (1999). *Nature*, 399, 806-9.
- Goldman, J.M. & Melo, J.V. (2001). *N Engl J Med*, 344, 1084-6.
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C. & Perez, J.M. (2001). *Mol Pharmacol*, 59, 657-63.
- Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Kanda, Y., Hisamoto, K., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Kanzaki, T. & Murata, Y. (2000). *Cancer Res*, 60, 5988-94.

- Kharbanda, S., Pandey, P., Ren, R., Mayer, B., Zon, L. & Kufe, D. (1995a). *J Biol Chem*, 270, 30278-81.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.M., Weichselbaum, R.R. & Kufe, D.W. (1995b). *Nature*, 376, 785-8.
- Kharbanda, S., Yuan, Z.M., Weichselbaum, R. & Kufe, D. (1998). *Oncogene*, 17, 3309-18.
- Klejman, A., Rushen, L., Morrione, A., Slupianek, A. & Skorski, T. (2002). *Oncogene*, 21, 5868-76.
- Lakin, N.D. & Jackson, S.P. (1999). *Oncogene*, 18, 7644-55.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S.W., Selvakumaran, M., Williams, S.J., Hamilton, T.C. & Testa, J.R. (2000). *Cancer Res*, 60, 5390-4.
- Page, C., Lin, H.J., Jin, Y., Castle, V.P., Nunez, G., Huang, M. & Lin, J. (2000). *Anticancer Res*, 20, 407-16.
- Pandey, P., Raingeaud, J., Kaneki, M., Weichselbaum, R., Davis, R.J., Kufe, D. & Kharbanda, S. (1996). *J Biol Chem*, 271, 23775-9.
- Perez, R.P. (1998). *Eur J Cancer*, 34, 1535-42.
- Persons, D.L., Yazlovitskaya, E.M., Cui, W. & Pelling, J.C. (1999). *Clin Cancer Res*, 5, 1007-14.
- Rane, M.J., Coxon, P.Y., Powell, D.W., Webster, R., Klein, J.B., Pierce, W., Ping, P. & McLeish, K.R. (2001). *J Biol Chem*, 276, 3517-23.
- Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9248-53
- Sanchez-Perez, I., Murguia, J.R. & Perona, R. (1998). *Oncogene*, 16, 533-40.
- Sanchez-Perez, I. & Perona, R. (1999). *FEBS Lett*, 453, 151-8.
- Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, Y. & Gutkind, J.S. (2000). *Cancer Res*, 60, 2464-72.
- Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V.J., Servitja, J.M. & Gutkind, J.S. (2002). *Oncogene*, 21, 974-9.
- Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Teclé, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W.R. & Saltiel, A.R. (1999). *Nat Med*, 5, 810-6.
- Simpson, L. & Parsons, R. (2001). *Exp Cell Res*, 264, 29-41.
- Smith, G.C. & Jackson, S.P. (1999). *Genes Dev*, 13, 916-34.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. & Mak, T.W. (1998). *Cell*, 95, 29-39.
- Viniegra, J.G., Losa, J.H., Sanchez-Arevalo, V.J., Cobo, C.P., Soria, V.M., SR, Y.C. & Sanchez-Prieto, R. (2002). *Oncogene*, 21, 7131-6.

Wang, X., Martindale, J.L. & Holbrook, N.J. (2000). J Biol Chem, 275, 39435-43.

Yu, C., Krystal, G., Varticovski, L., McKinstry, R., Rahmani, M., Dent, P. & Grant, S. (2002). Cancer Res, 62, 188-99.

Zlatanova, J., Yaneva, J. & Leuba, S.H. (1998). Faseb J, 12, 791-9.

Objetivos

- 1.-Estudios de la activación de MAPK y PI3K/AKT por tratamientos antitumorales basados en cisplatino radioterapia y STI571 en diversos modelos celulares representativos de patologías tumorales habitualmente tratadas con Cisplatino, radioterapia y STI571 (cabeza y cuello, pulmón, ginecológico y Leucemia Mieloide Crónica).
- 2.-Estudio de la implicación MAPK y AKT en los fenómenos de resistencia a quimio y radioterapia. Se pretende saber si la desregulación de la vía (falta o activación constitutiva) puede explicar fenómenos de quimio o radio resistencia. Para ello se recurrirá al uso de inhibidores químicos, dominantes negativos usando transducción retroviral o uso de siRNA. Igualmente se procederá a los pertinentes estudios de localización celular de MAPK y AKT.
- 3.-Generación de líneas resistentes a cisplatino o STI571, mediante protocolos de cultivo con las distintas drogas. De forma paralela se generan las mismas líneas con alteraciones conocidas en rutas de señalización implicadas en la respuesta a dichos tratamientos.
- 4.-Mediante técnicas de arrays se intentará buscar nuevos marcadores de resistencia celular. Para ello compararemos los patrones de expresión de la línea celular que no ha sido expuesta al fármaco con aquellos de la línea resistente al fármaco mediante co-cultivo o aquella donde hemos alterado alguna vía de señalización.
- 5.- evaluación en modelos animales de los datos obtenidos en líneas celulares . Se generan tumores a partir de las líneas celulares descrita en el apartado tres. De forma paralela se intentara la generación de ratones transgénicos con formas hiperactivas o inactivas de las diferentes quinasas en estudio.
- 6.-Comparación de la respuesta al cisplatino radiación o STI571 con los niveles basales de actividad de cada ruta evaluados mediante inmunohistoquímica y western blot en muestras de pacientes.
- 7.-Medición de la expresión de proteínas como Abl, ATM, DNAPK para su correlación con la activación de SAPK y PI3K/AKT, así como con la respuesta al tratamiento.
- 8.- Evaluación en biopsias de los posibles marcadores obtenidos en los ensayos de genómica.

Métodos experimentales

Líneas celulares:

Líneas procedentes de tumores con alteraciones conocidas:

Se utilizarán como controles líneas celulares como las HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados), IMR90 (fibroblastos humanos normales) baf 3 (precursores de células B) o precursores mieloides murinos como 32D. Entre los modelos tumorales que nos planteamos estudiar para cada patología tenemos :Hela, A431, SKUT1, SKUT1B, Skov3, NIH-OVCAR3 (tumores ginecológicos), HN19, HN30, HN26, SSC15, SSC25, (líneas celulares derivadas de tumores de cabeza y cuello), HOP-62, A549, HCl-1355, SK-LU-1, NCI-H1703, (carcinoma de pulmón), K562, Lama 84, KCL 22 (líneas celulares derivadas de Leucemia Mieloide crónica) así como otros modelos . Las condiciones de cultivo (medio, porcentaje de suero y otros nutrientes) varían para cada línea celular. No obstante se requiere en todos los casos 5% CO₂ y 37°C.

Líneas productoras de retrovirus:

Para producción de alto título de forma transitoria se utilizaran líneas derivadas de 293T (células embrionarias de riñón humano con sobreexpresión de antígeno T grande de SV 40). Entre ellas se incluyen las BosC23, Phoenix anfotrópica (capaces de generar virus con infectividad en humanos), Phoenix ecotrópicas (con capacidad de infectar células murinas) y GP293 (esta línea celular es pantrópica lo que permite que la infección por los retrovirus generados abarque diferentes especies). Todos estos clones derivados de 293T son crecidos en DMEM más 10% de FCS y antibióticos. Los títulos de infección en estas líneas suelen estar en torno a 10⁶-10⁷. En estable se utilizarán la línea celular Gp+E, en sus versiones ecotrópica y anfotrópica. Además, se utilizará la línea celular PA317 (anfotrópica). En este caso los títulos están en el rango de 10³-10⁴.

Vectores

pLPCX. Este vector retroviral clásico presenta un sitio de clonaje (MCS), cómodo con dianas HindIII, EcoR1, NotI y XhoI lo que le convierte en un vector ideal para la generación de retrovirus de expresión constitutiva. Además la presencia del promotor del citomegalovirus (CMV promoter) asegura una expresión elevada en casi todos los sistemas celulares conocidos.

pLCNX: Al igual que en el caso anterior es un vector retroviral .

pLWZL: Al igual que en el caso anterior es un vector retroviral .

pCEFL: este vector desarrollado en la boratorio del Dr.Gutkind en los NIH, presenta un excelente sitio de cloanje y además se puede usar la versión GFP que nos permitirá marcar con proteína fluorescente verde (GFP) cualquiera de la quinasas en estudio.

Generación de dominantes negativos

Para la generación de dominantes negativos y quinasas inactivas se procederá al uso de técnicas de mutagénesis dirigida. Para ello se requiere la técnica de PCR solapante o de KITS comerciales como el de la compañía Stratagene. Se cambiarán aminoácidos del centro activo, de unión a ATP, del dominio regulador o del dominio de activación. Se hará tanto en las quinasas propiamente dichas (AKT, ERK1/2, p38,.....) como en determinados activadores de estas (MKK3, MKK6, MKK1, p85, p110, MKK7, MEK1, MEK2).

Uso de RNAi

Recientemente el grupo de Yang Shi, el facultada de Medicina de Harvard, ha desarrollado un sistema que permite la anulación selectiva de la expresion de genes basandose en los siRNA capaces de degradar RNA. Para ello se diseña un pequeño oligonucleotido de 21 pares, se ha demostardo que tamaños mayores de 30 pares de bases no son efectivos , de bases que bajo el control de un promotor de RNA Polimerasa III. Esta polimerasa tiene la ventaja de dirigir la sintesis de pequeños RNA no codificantes usando como molde DNA cuyo extremo 3' sea un repetición de 4 a 5 Timidinas. Para ello se coloca el mismo oligo de forma opuesta y separado por un

pequeño espaciador el resultado es una molécula de RNA de cadena doble que forma una pequeña orquilla. Estas moléculas son estructuralmente muy similares a los pequeños RNAs de interferencia (siRNA) que permiten el bloqueo específico de genes. En el gráfico adjunto se explica de forma resumida el diseño experimental de Sui y cols (PNAS, 99, 5515-5520, 2002). En la actualidad ya existe este sistema adaptado para vectores retrovirales de la compañía OligoEngine basados en el protocolo del grupo de Pamela A. Silver (BMC, Biotechnology, 2:15, 2002)

Ensayos de expresión:

La forma más común es por técnicas de Western Blot. Para ello las células serán lisadas en un tampón de lisis en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras serán sometidas a electroforesis desnaturalizante en acrilamida (SDS-PAGE). Los geles serán transferidos a nitrocelulosa en tampón con Tris-Glicina y Metanol 20%. Las membranas serán bloqueadas en tampón PBS 4% de albúmina bovina (BSA) y 0,5% Tween 20. Finalmente las membranas bloqueadas serán incubadas con anticuerpo contra las proteínas de estudio. De forma paralela se harán ensayos de inmunocitoquímica que permitirán obtener una idea de la localización de la proteína.

Ensayos de quimio y radioresistencia

Las líneas celulares generadas serán evaluadas para resistencia a cisplatino, por el método de cristal violeta. Este método ya ha sido utilizado en repetidas ocasiones para evaluar viabilidad celular. Las células son sembradas en placas de 24 a diferentes densidades (1×10^3 - 1×10^4) e incubadas con las drogas (en concentraciones variables sobre el IC₅₀) durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente las células son fijadas en glutaraldehído al 4%, teñidas con cristal violeta al 0.1% y retirado el exceso de colorante mediante lavado en agua destilada. El colorante es recuperado mediante ácido acético al 10% y medido en un espectrofotómetro con un filtro de 490nm. En el caso de radioterapia se procederá de la misma forma y se establecerá un ensayo de focos a 15 días. De forma paralela a los resultados serán confirmados con otros abordajes como el ensayo MTT.

Ensayos de apoptosis.

Para la evaluación de apoptosis tras tratamiento con los diversos quimioterápicos y se recurrirá a tres dos técnicas ampliamente establecidas

Degradación de DNA geonómico: Esta técnica se basa en la degradación del DNA entre histonas que ocurre en el proceso apoptótico. Tras la extracción del DNA geonómico se analizará en geles de agarosa al 1,8% visualizándose por tinción con Bromuro de Etidio.

Citometría de flujo: Las células apoptóticas presentan una característica distribución dentro del ciclo celular, situándose en una población previa al pico de G₀/G₁. A continuación en el citómetro la población inicial es seleccionada por tamaño y complejidad (FSC /SSC) y dentro de la población seleccionada se valora el contenido de DNA (Ioduro de propidio FL2) frente a número de células. Esta técnica presenta la ventaja de ser cuantitativa y se complementa con la anterior.

Ensayos quinasa:

Esta técnica permite de forma directa medir la actividad enzimática. Se utilizarán sustratos específicos para cada quinasa: p38 GST-ATF-2 o Proteína Básica de Mielina (MBP), JNK GST-Cjun, c-Abl GST-CRKI, AKT GST-GSK3 o Histona H-1.

Western blot con fosfoanticuerpos

En la actualidad se han desarrollado anticuerpos de nueva generación que reconocen específicamente regiones fosforiladas de determinadas proteínas. En el caso de proteínas quinasas la forma de activación es siempre por una cascada de fosforilaciones. Así en el caso de las MAP quinasa existe siempre una MKK que fosforila a la MAP quinasa correspondiente. Dicha fosforilación ha sido aprovechada para generar anticuerpos que reconocen exclusivamente la forma fosforilada, que es la forma actividad. El protocolo de este tipo de western es similar al ya descrito si bien existen algunas diferencias. El tampón de lisis debe contener inhibidores de fosfatasa (NaPPi, NaFl, NaVO₄). Este paso es clave ya que la ausencia de estos compuestos puede eliminar los grupos fosfatos de los residuos fosfoaceptores durante el proceso de lisis o la inmunoprecipitación. El anticuerpo debe incubarse obligatoriamente un mínimo de 6 horas a 4°C. El resto del proceso es realizado de forma similar al protocolo normal de western blot. En la actualidad diversas compañías tienen en el mercado anticuerpos contra diversas proteínas quinasa como p38 MAPK, JNK, ERK1 y 2, AKT/PKB.....que permiten una fácil detección de las formas fosforiladas.

Técnicas de inmunohistoquímica.

Con objeto de poder correlacionar el status de las diferentes rutas de transducción con la respuesta a tratamiento con quimio y radio recurriremos al uso de una batería completa de fosfoanticuerpos para inmunohistoquímica. A diferencia de una inmunohistoquímica convencional, aquí los pasos de bloqueo (BSA 4%) y de incubación con el primer anticuerpo (a 4°C y un mínimo de 9 horas) hacen que este tipo de abordajes no sean factible con las técnicas convencionales de inmunohistoquímica. No obstante la Unidad de Patología Molecular cuenta con una amplia experiencia en el manejo de anticuerpos.

Estudios de genómica

Este tipo de abordajes se realizará utilizándose el Oncochip, desarrollado por el C.N.I.O, que contiene 13000 sondas de cDNA. Incluye sondas para todos los genes conocidos implicados en cáncer: <http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip/>. y contiene cDNA de secuencias de librerías específicas de tejidos tumorales. Con el fin de determinar los perfiles de expresión diferenciales entre líneas celulares sensibles y resistentes al tratamiento, se hibridará el cDNA obtenido de dichas muestras en el OncoChip-CNIO, chip de cDNA producido por el CNIO (Tracey *et al.* Am J Pathol; 2002.161:1825). La extracción de ARN total se realizará, en el caso de las líneas celulares con RNeasy kit (Qiagen), y en el caso de los tumores con Trizol seguido de purificación con el kit Rneasy de Quiagen. Se testará la calidad del ARN total purificado en geles de agarosa/formaldehído. A continuación se marca el cDNA sintetizado con dos fluorocromos distintos: Cy5-dUTP (verde) (el procedente de las líneas celulares control usada como referencia), o con Cy3 (rojo) (el cDNA de la línea en estudio). En el proceso de transcripción en reverso se usará SuperScript II reverse-transcription kit (Gibco Brl). Para cada reacción, se usarán 30µg de ARN total y oligo dT. En aquellas muestras que así lo requieran por escasez de material, se amplificará el RNA extraído previo a su hibridación. Para ello se realiza la transcripción in vitro del cDNA con la enzima T7 RNA polimerasa, obteniéndose el RNA amplificado el cual ya se somete al proceso antes descrito(3 µg).Para la lectura de los resultados, proceso consistente en el establecimiento de la malla conformada por los puntos inmovilizados y tratamiento de la imagen para constituir la matriz de puntos, se medirá la fluorescencia de emisión en cada punto mediante un Scanner Laser Confocal "Agilent G2565AA Microarray Scanner System" (Agilent Technologies, Inc). El escáner utiliza láseres de Helio-Neón en rojo y verde para excitar Cy5 y Cy3. Se escanean los portaobjetos y los datos de fluorescencia se almacenan como imágenes. Se examinan las intensidades y se calculan los niveles de expresión relativa de cada punto correspondiente a cada gen para identificar la expresión génica diferencial. Se ha de detectar y corregir el ruido de fondo y normalizar los datos usando los controles positivos y negativos. El tratamiento de la imagen (tras sustracción del ruido de fondo) se realiza mediante el software GenePix 5.0. Las medidas de fluorescencia serán sujeto de una sustracción de ruido de fondo automática y los valores de ratio Cy3/Cy5 serán normalizados frente a la media del valor de ratio de todos los puntos del array. Para el análisis de los datos de expresión obtenidos de los microarrays de cDNA:, se usarán los programas desarrollados por la unidad de bioinformática del CNIO y que están disponibles en la web del CNIO: <http://bioinfo.cnio.es/cgi-bin/tools/multest/multest.cgi>. Las funciones biológicas se asignarán usando

GENECARDS database en (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>) o la clasificación funcional Gene Ontology.

Otra posibilidad es el uso del sistema de la compañía Affymetrix que ha sido puesto a punto en diferentes institutos como el CIC-USAL. Esta plataforma utiliza chips de oligonucleótidos impresos por fotolitografía fabricados por Affymetrix. Concretamente, cada gen estaría representado por 16 oligonucleótidos (25 bases cada uno) de la región 3' del cDNA. El marcaje del RNA se realiza en tres pasos: En primer lugar se obtiene cDNA por transcripción en reverso utilizando oligodT(T7p). Posteriormente, se sintetiza el cDNA de doble cadena mediante DNA polimerasa, RNasa H y DNA ligasa. Finalmente, se obtendría un RNA antisentido (cRNA) mediante transcripción in vitro empleando T7 RNA polimerasa y nucleótidos marcados con biotina. La hibridación del chip se realiza durante 16 horas a 45 oC tras fragmentar el cRNA a 95 oC. Posteriormente, el chip se incuba con el fluoróforo Streptavidina-ficoeritrina (SAPE), seguido de un anticuerpo Anti Streptavidina-Biotina, y de nuevo con SAPE con el fin de conseguir una amplificación de la señal. Estas incubaciones se realizan de manera automatizada en una Estación de Fluidos lo que permite una alta reproducibilidad de las señales. El chip escaneado se analiza mediante informáticos que utilizan algoritmos estadísticos para determinar la presencia o ausencia de un transcrito y si su expresión cambia de manera significativa respecto al control. En casos en los que existen varias condiciones experimentales, se realizarán análisis más complejos de los resultados que permiten agrupar los genes según diferentes patrones de expresión (clustering), lo que permitiría la determinación de nuevos marcadores tumorales o nuevas dianas terapéuticas. Actualmente existen disponibles diferentes chips de Affymetrix con genes humanos. Uno de los más interesantes es el set HG U133 que contiene 33.000 transcritos diferentes en dos chips, conteniendo tanto genes conocidos como ESTs. Este permite un análisis global de la expresión génica en las diferentes condiciones experimentales. Este chip permite también la identificación de genes cuya función aún no se conoce pero que pueden estar afectados en nuestras condiciones experimentales, lo que abriría nuevas vías de investigación. Los resultados obtenidos con microarrays se validarían mediante técnicas convencionales tales como RT-PCR, Northern o Western blot.

Estudios en modelos animales

En lo referente a los animales se procederá de dos maneras:

- A) Estudios de tumorigenicidad en ratones desnudos. Se inyectaran de forma subcutánea u ortotópica, si el modelo lo permite, y se evaluará la tumorigenicidad y respuesta a los distintos tratamientos de las diferentes líneas generadas a lo largo del proyecto. En condiciones ideales el experimento modelo sería aquel en el que sobre una determinada línea celular se compararía con la misma línea resistente al tratamiento y aquellas que tienen anulada de forma selectiva cada una de las rutas de señalización.
- B) La generación de animales transgénicos se hará en colaboración con CBATEG de la Universidad Autónoma de Barcelona. El coste medio en la generación de un ratón es de 7000€. Por ello, solo se procederá a la generación de ratones modificados genéticamente en aquellos casos en el que los resultados en cultivo y en ratones desnudos indican un claro potencial terapéutico. El proceso consiste en la generación del constructo en donde se integrara el transgen bajo el control de un promotor específico. En nuestro caso y de forma general el promotor suele ser citokeratinas lo que implica expresión en piel del transgen. No obstante, se recurrirá al uso de promotores específicos de otros tejidos, o bien inducibles como los sistemas Tet-On o Tet-OFF. Posteriormente se procede a la linearización del DNA, purificación y por último, usando la tecnología de microinyección de embriones de 1 célula de ratones B6SJL para la generación de ratones transgénicos (normalmente se realiza de 15 a 17 inyecciones). Tras el periodo de gestación se procede al genotipado de los animales por técnicas de southern blot y posteriormente se selecciona dos animales para generar las respectivas colonias. Estos animales nos pueden permitir evaluar de forma real, en un modelo biológico complejo, el papel de estas rutas de señalización en la respuesta a la terapia de cáncer y su participación en la génesis de un determinado tipo de tumor.

Equipo investigador

El equipo investigador tiene una amplia experiencia en el campo de la quimio y radioterapia in vitro e in vivo. Así, ha sido pionero en establecer el papel que como quimio y radio sensibilizante tiene el gen E1a de adenovirus, como se refleja en un amplio grupo de publicaciones (International Journal of Cancer. 1995; 60: 235-243, Oncogene.1995;11:675-682, Oncogene, 13, 1083-1092, 1996, Cancer Gene Therapy, 1998, 5:215-22, Cancer Gene Therapy , 1999, 6:554-63). Por tanto la unidad de Oncología molecular del CRIB cuenta con experiencia suficiente el manejo de líneas celulares, animales de laboratorio, así como el uso de antitumorales.

En lo referente a transducción de señales el equipo investigador cuenta ya con cierta experiencia, (Oncogene 2002, 21,7131-7136). Por otro lado el investigador principal de este proyecto ha realizado su postdoctorado en el laboratorio del Dr. Gutking, uno de los mayores especialistas en transducción de señales y con el cual se mantiene una activa colaboración, centrándose en el efecto de la quimioterapia en p38 MAPK demostrando que es capaz de controlar la activación de moléculas como p53 y p73 (Cancer Research, 2000, 60: 2464-2472; Oncogene, 2002. 21, 974-979), claros mediadores del efecto antitumoral del Cisplatino. En este sentido el equipo dirigido por el Investigador principal ha demostrado el papel de las rutas PI3K/Akt y p38 MAPK tienen en la respuesta celular al cisplatino (Oncogene 2002, 21,7131-7136, Oncogene 2003, 3998-4006), si bien los modelos utilizados no son propiamente tumorales tratándose en ambos casos de células normales (IMR90 o HaCaT).

Además el investigador principal cuenta con una amplia experiencia en el manejo de vectores de expresión plasmídicos y retrovirales. Igualmente el investigador principal cuenta con una gran experiencia en el manejo del cisplatino o la radiación ionizante como lo demuestran las más de 14 publicaciones en las cuales el cisplatino o radioterapia han sido objeto de estudio. En el caso del STI571 el investigador principal dispone ya de un Material Transfer Agreement con la compañía Novartis lo que garantiza el abastecimiento del compuesto así como la generación de líneas celulares resistentes a STI571 cedidas.

Los Doctores García Ramírez y Villuendas cuentan con una sólida experiencia en al campo de la genómica, tanto en el uso de sistemas comerciales como en el desarrollos de nuevas técnicas basadas en arrays, como lo avalan sus numerosas publicaciones.

El grupo del Dr. Llopis es uno de los más importante a nivel nacional en el uso de técnicas de microscopia sobre células vivas, siendo uno de los pocos grupos que han desarrollado el sistema FRET para el estudio de interacciones entre proteínas por microscopia en células vivas. En este sentido destaca sus importantes contribuciones en el uso de la GFP como herramienta en estudios biológicos.

Igualmente el equipo clínico que participa en este proyecto garantiza la recogida de muestras y diagnostico así como el seguimiento de los pacientes en todos los campos de la patología tumoral (Anatomía patológica, hematología, oncología médica, radioterápica), como demuestra su participación en números ensayos clínicos.

Los Investigadores senior del presente en este proyecto son

Dr. Ricardo Sánchez Prieto

Jefe del laboratorio de Oncología molecular CRIB

Investigador del CRIB

Dr. Juan Llopis Borrás

Jefe del área de Fisiología Facultad de Medicina UCLM

Investigador del CRIB

Dr. José Javier García Ramírez

Profesor del Área de Bioquímica Facultad de Medicina UCLM

Investigador del CRIB

Dra. Maria José Ruiz Hidalgo

Profesor del Área de Bioquímica Facultad de Medicina UCLM

Investigador del CRIB

Dra. Raquel Villuendas

Investigadora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Grupo de Patología Molecular, linfomas

Dr. Manuel Aienzar

Jefe del servicio de Anatomía patológica

Complejo hospitalario Universitario de Albacete

Dra. Maria Victoria Villas Sánchez

Jefe del servicio de Oncología Raterápica

Complejo hospitalario Universitario de Albacete

Dr. Juan Carlos Gomez

Jefe del servicio de Hematología

Complejo hospitalario Universitario de Albacete

Dra. Carmen Alonso

Jefe del servicio de Oncología Médica

Complejo hospitalario Universitario de Albacete

Plan de trabajo y cronograma

1) Caracterización de las rutas de señalización en la respuesta a Cisplatino, STI571 y radioterapia. Generación de

Líneas resistentes por cocultivo (9 meses):

En este caso se analizará por técnicas de western blot tras incubación con los diversos agentes antitumorales (cisplatino, STI571 y radiación ionizante) que rutas son activadas. En algunos casos, como ejemplo JNK, los fosfoanticuerpos suelen ser poco efectivos, por lo que se procederá a ensayos quinasas. En todos los casos se realizarán ensayos de viabilidad para poder trabajar con dosis equitóxicas de Cisplatino, STI571 y radiación ionizante, permitiendo así excluir falsos positivos debido a una situación de estrés generalizado. De forma paralela se empezará a generar líneas resistentes por co-cultivo con cisplatino y STI571.

2) Implicación de las rutas de señalización en fenómenos de resistencia (12 meses):

Para ello se seguirán los siguientes abordajes:

Uso de inhibidores. En la actualidad se dispone de inhibidores para todas las rutas. Se compara la respuesta frente a quimioterapia y radioterapia en presencia y ausencia del inhibidor. Pese a su dudosa especificidad este abordaje permitirá un rápido proceso de "Screening", que permitirá excluir si la activación de una ruta tiene o no consecuencias en la respuesta celular a los tratamientos.

Generación de dominantes negativos. Una vez generadas dichas construcciones en vectores retrovirales se infectarán diversas líneas celulares en donde se medirá los patrones de quimio y radio resistencia.

Uso de siRNA: Esta novedosa técnica se basa en el diseño de pequeños oligos (21 nucleótidos) diseñados contra regiones específicas de cada proteína. Esta técnica ha demostrado ser una potente forma de anular la expresión de genes endógenos y transfectados. De forma paralela se empezará a generar líneas resistentes a los diferentes fármacos mediante el cultivo rutinario en presencia de la droga. Este tipo de abordajes es largo (entorno a 10 meses) pero es perfectamente compatible con los dos apartados primero y segundo.

3) Estudios de traducción de señales y localización celular (9 meses):

Las vías de traducción de señales que en los apartados anteriores hayan indicado una clara especificidad por una determinada terapia y estén implicados en fenómenos de resistencia serán analizadas más en detalle. Se intentará ver dentro de la ruta cuál/es es/son la/s molécula/s clave/s en la activación. Así en el caso de rutas como la de p38MAPK existen dos activadores directos MKK6 o MKK3 y pretendemos evaluar el papel de cada activador.

Como se comentó en la introducción la localización de este tipo de proteínas puede ser crítica en sus funciones biológicas. Para ello se generarán formas marcadas con GFP y se estudiará su localización en respuesta a los tratamientos antitumorales.

4) Relación de las rutas de señalización MAPK y PI3K/AKT con moléculas centrales en la respuesta al estrés genotóxico (9 meses):

La respuesta a agentes que dañan el ADN y el estrés genotóxico en general, está controlada por una serie de proteínas como la quinasa Abelson (Abl), el gen de ataxia (ATM) o la quinasa activada por daño al ADN (DNA-PK). Pretendemos establecer el nexo, si existiera, entre estas proteínas y las rutas de señalización en estudio.

5) Estudios de genómica (18 meses):

Una vez evaluado el papel de cada ruta de señalización en la respuesta a cada tratamiento compararemos los patrones de resistencia entre las células generadas por la presión selectiva del fármaco y aquellas en las que hemos modificado selectivamente rutas de señalización. Posteriormente se obtendrá RNA en presencia/ausencia

de la droga y se comparara los patrones de expresión entre las distintas líneas y condiciones. Como se indica en el apartado de métodos este apartado se realizará en colaboración con el CNIO así como en otros servicios de genómica con tecnología affimetrix como los desarrollados en el centro del Cáncer de la Universidad de Salamanca (CIC-USAL)

6) Generación de animales transgénicos y estudios en modelos animales (48 meses):

Una vez estudiadas las diferentes rutas y obtenidas las distintas líneas celulares se procederá primero a los estudios en animales desnudos (aproximadamente de 6 a 9 meses) y en función de estos datos se procederá a la realización de los animales transgénicos más interesantes.

7) Recogida de biopsias, análisis de niveles basales y post tratamiento (36 meses):

A lo largo del primer año se empezara con la recogida de algunas muestras al objeto de poder optimizar las técnicas necesarias. Todas las biopsias serán congeladas a -80 y se procederá a su análisis por inmunohistoquímica o western blot. En todos los casos se procederá a la evaluación de las biopsias en un plazo de dos meses. Como control se intentará llevar tejido normal no afectado. Como se indica en el apartado de equipo investigador la participación del Servicio de anatomía patológica del CHUA garantizan la recogida y procesamiento de las biopsias.

8) Seguimiento y correlaciones clínico/patológicas (36 meses).

Cada equipo clínico procederá al seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio. Para ello se evaluarán parámetros clínicos de respuesta al tratamiento que serán confrontados con los datos obtenidos en las diferentes biopsias/muestras. Posteriormente se establecerán las conclusiones utilizando abordajes estadísticos estandar.