

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Facultad de Medicina



IMPORTANCIA DE LA TOPO II ALFA CITOPLÁSMICA EN CÁNCER DE PULMÓN

Caracterización de una línea celular humana de cáncer de pulmón con resistencia innata a etopósido y tenipósido, mediada por la localización citoplasmática de la Topo II alfa.

Biol. Victor M. Bautista de Lucio
Tutor: Dr. Vicente Madrid Marina
Comité Tutorial: Dra. Marieta Tuena Sangri
Dr. Mauricio Salcedo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradecimientos

Quiero agradecer a mis tutores, Dr. Vicente Madrid Marina, Dra. Marieta Tuena Sangri y Dr. Mauricio Salcedo, que durante el doctorado me hicieron las observaciones y comentarios pertinentes, que me ayudaron en mi trabajo y en mi crecimiento profesional.

Así también, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a México, esta gran oportunidad que me otorgaron.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, a todos los amigos de los laboratorios de Bioquímica y Cáncer Pulmonar, gracias por su apoyo y su ayuda.



Dedicatoria

Deseo dedicar este trabajo a mis padres, Gonzalo y Esperanza, a mi hermano Rubén, gracias por todo su apoyo. “Los quiero mucho”

A mi mejor amiga y compañera, Mariel, por los momentos compartidos y tu incomparable apoyo.

A mis amigos y amigas, de antes y de ahora, que siempre han estado presentes en mi vida.



Agradecimiento Especial

El Biol. Victor Manuel Bautista de Lucio, con número de registro 144024, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado para su formación académica.

Dra. María del Carmen Gómez Eichelman

Presidente

Dr. Vicente Madrid Marina

Secretario

Dr. Moisés Selman Lama

Vocal

Dr. Félix Recillas Targa

Vocal

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Vocal

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Suplente

Dra. Marieta Tuena Sangri

Suplente

I. ABREVIATURAS	8
II. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	9
III. RESUMEN	10
IV. ABSTRACT	11
V. INTRODUCCIÓN	12
VI. Resistencia múltiple a fármacos	13
VI.1 Cinética de crecimiento	13
VI.2 Mutación espontánea	14
VI.3 Causas de la resistencia a la quimioterapia	14
VI.3.1 Factores extracelulares	15
VI.3.2 Factores Intracelulares	15
VI.3.2.1 Disminución de la concentración del fármaco al interior de la célula	15
VI.3.2.2 Expulsión a través de la membrana celular	15
VI.3.2.3 Secuestro en vesículas citoplasmáticas y/o por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma	16
VI.3.2.4 Alteración en el metabolismo intracelular del fármaco	16
VI.3.2.5 Alteraciones del blanco molecular	17
VII. EL FENÓMENO DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS	18
VII.1 Proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos (proteínas MDR)	18
VII.2 Glicoproteína P (pg-P)	19
VII.3 MRP (Multidrug Resistance-associated Protein)	19
VII.4 LRP (Lung Resistance-related Protein)	22
VII.5 BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	23
VIII. RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASAS II	24
VIII.1 Topoisomerasas	24
VIII.2 Topoisomerasas tipo I (topo I)	24
VIII.3 Topoisomerasas tipo II (topos II)	25
VIII.4 Topoisomerasa II alfa	26
VIII.4.1 Gen de topo II alfa	26
VIII.4.2 Regulación de la expresión del gen de topoisomerasa II alfa	27
VIII.4.3 La proteína de topo II alfa	29

VIII.4.4 Distribución Intracelular	31
VIII.4.5 Señales de localización nuclear en topo II alfa	31
VIII.4.6 Modificaciones postraduccionales	32
VIII.4.7 Ciclo catalítico de las topo II	34
IX. RESISTENCIA A FÁRMACOS MEDIADA POR TOPO II ALFA	37
IX.1 Inhibidores de topo II alfa	37
IX.2 Complejos de corte topo II-DNA	37
IX.3 Acciones del etopósido sobre la topo II	40
IX.4 Formación del complejo ternario topo II-DNA-etopósido	40
IX.5 Mecanismo de acción del etopósido	41
IX.6 Alteraciones en la topo II alfa	42
IX.6.1 Expresión disminuida de topo II alfa	42
IX.6.2 Mutaciones en topo II alfa	43
IX.6.3 Topo II alfa citoplásmica	44
X. JUSTIFICACIÓN	46
XI. ANTECEDENTES PARTICULARES	47
XII. HIPÓTESIS	48
XIII. OBJETIVOS	49
XIV. MATERIAL Y METODOS	50
XIV.1 Reactivos	50
XIV.2 Cultivo celular	50
XIV.3 Ensayo de citotoxicidad y determinación del IC ₅₀	50
XIV.4 Preparación de extractos nucleares	51
XIV.5 Preparación de los extractos celulares para a Φ -174	51
XIV.7 Inmunocitoquímica	52
XIV.8 Western blot	52
XIV.9 Análisis por RT-PCR	53
XIV.10 Northern blot	53
XIV.11 Análisis de la región 3' del gen de topo II alfa por 3'RACE	54
XV. RESULTADOS	55
XV.1 Análisis por RT-PCR de la expresión de genes relacionados con la MDR	55
XV.2 Actividad catalítica de topo II	57
XV.3 Localización subcelular de topo II alfa	58

XV.4 <i>Análisis del extremo 3' del RNAm de topo II alfa</i>	59
XV.5 <i>Topo II alfa truncada de 160 kDa</i>	62
XVI. DISCUSIÓN	64
XVII. CONCLUSIONES	69
XVIII. PERSPECTIVAS	70
XIX. REFERENCIAS	72
XX. ANEXOS	89

I. ABREVIATURAS

ABC	Casette de unión a ATP
CKII	Cinasa de caseína II
gp-P	Glicoproteína-P
HRP	Peroxidasa de rábano
ICB	Cajas invertidas CCAAT
ICE	Elementos invertidos CCAAT
MDR	Resistencia múltiple a fármacos
<i>mdr-1</i>	Gen de <i>mdr-1</i>
MRP	Proteína relacionada a la multiresistencia
LRP	Proteína de resistencia en pulmón
BCRP	Proteína de resistencia en cáncer de mama
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
CPN	Complejo del poro nuclear
PKC	Cinasa de proteína C
RUN	Regiones de Unión de Nucleótido
SEN	Señal de Exportación Nuclear
SLN	Señal de Localización Nuclear
Topoisomerasas	Topos
Topoisomerasa II alfa	Topo II alfa
Topoisomerasa II beta	Topo II beta

II. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I.	Perfil de resistencia de la línea celular INER-37, así como de otras líneas celulares de cáncer de pulmón a fármacos quimioterapéuticos.	p.47
Tabla II.	Mutaciones en topo II alfa.	p.71
Figura 1.	Porcentaje de mortalidad por tumores malignos.	p.6
Figura 2.	Diagrama esquemática de la acción de las topoisomerasas.	p.23
Figura 3.	Gen y proteína de topo II alfa.	p.24
Figura 4.	Esquema de la región del promotor del gen de topo II alfa en humanos.	p.26
Figura 5.	Estructura de la proteína topo II alfa.	p.28
Figura 6.	Sitios y niveles de fosforilación en la topo II alfa.	p.31
Figura 7.	Ciclo catalítico de las topoisomerasas II.	p.33
Figura 8.	Rompimiento transitorio del DNA catalizado por la topo II alfa.	p.34
Figura 9.	Diferencia entre los fármacos que interactúan con las topoisomerasas II.	p.37
Figura 10.	Efectos del complejo de corte topo II-DNA en la célula.	p.40
Figura 11.	Análisis por RT-PCR de la expresión de genes relacionados con MDR en células INER-37.	p.57
Figura 12.	Ensayo de actividad catalítica de topo II por desenrollamiento de DNA de 174.	p.58
Figura 13.	Inmunocitoquímica para topo II alfa en células INER-37 y HeLa.	p.59
Figura 14.	Análisis por RT-PCR de las últimas 2 kb de la región 3' del gen de topo II alfa.	p.60
Figura 15.	Ensayo de 3'RACE para el RNAm de topo II alfa.	p.61
Figura 16.	Análisis por Northern blot para el RNAm de topo II alfa.	p.62
Figura 17.	Análisis por Western blot de topo II alfa en extractos totales de células INER-37 y HeLa.	p.64

V. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que resulta de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en las células, que conducen a la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, y que favorecen la proliferación celular sin restricción. La transformación maligna relaciona alteraciones en la expresión de proteínas con una subsecuente proliferación clonal de las células alteradas ⁽¹⁾.

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que 7.6 millones de persona murieron por cáncer en el 2005, y que 84 millones de personas morirán en los próximos diez años ⁽²⁾. Más del 70% de las muertes por cáncer se presentan en países en desarrollo, donde la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer están limitados o no existen.

A nivel mundial el cáncer de pulmón es responsable de 1.3 millones de muertes al año ⁽³⁾. Es la causa más común de muerte en hombres y la segunda en mujeres ^(4,5).

En México, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte entre los tumores malignos en la población en general ⁽⁶⁾. Dentro de la mortalidad generada por tumores malignos, el cáncer de bronquios y pulmón representa el 1.4 % (Figura 1), afectando principalmente a la población de entre 35 y 64 años ^(6,7).

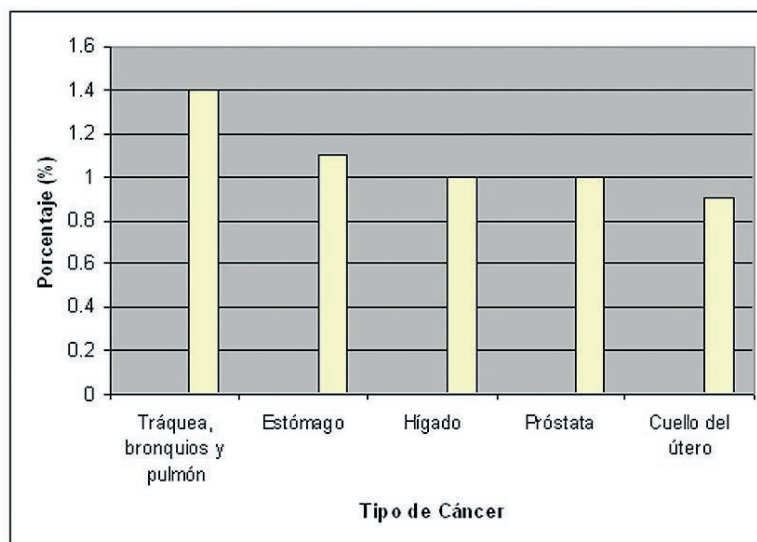


Figura 1. Porcentaje de mortalidad por tumores malignos. México, 2005. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, 2007.

VI. RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS

Uno de los principales problemas que se presenta en el tratamiento del cáncer es el fenómeno conocido como resistencia múltiple a fármacos o MDR (multidrug resistance). La resistencia múltiple a fármacos implica que las células tumorales desarrollen resistencia a la actividad de un amplio espectro de fármacos que no tienen relación estructural entre ellos y a los que no han sido previamente expuestos ⁽⁸⁾.

La resistencia a fármacos, independientemente de los mecanismos que la produzcan, puede ser innata o adquirida. La resistencia innata es aquella que presenta un tumor sin contacto previo a los fármacos, mientras que la adquirida es la que aparece tras el contacto con uno o varios de ellos ⁽⁹⁾. Existen dos características tumorales que parecen determinar la resistencia a la quimioterapia: la cinética de crecimiento y, en estrecha relación con esta, la aparición de mutaciones espontáneas.

VI.1 *Cinética de crecimiento*

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos actúan sobre las células en división, y cuanto menor sea la fracción de crecimiento, es decir, el porcentaje de células con actividad proliferativa, menor será el número de células presumiblemente sensibles al tratamiento. Por ello, las células que se encuentran fuera el ciclo celular, en la llamada fase Go, serán refractarias a la mayoría de los fármacos ⁽¹⁰⁾. Skipper et al (Revisado en 12), hace varias décadas, demostró la influencia de la cinética de crecimiento tumoral en la respuesta a la quimioterapia, con sus estudios de la leucemia de ratones L210. La leucemia L210 tiene una fracción de crecimiento del 100% y su población celular aumenta de forma exponencial. Los cálculos efectuados por Skipper et al, tras la administración de quimioterapia a los ratones leucémicos, demostraron que ésta eliminaba células leucémicas también de forma exponencial y que la probabilidad de curación dependía del volumen tumoral inicial. Las condiciones favorables de estos estudios, con ausencia de resistencia al tratamiento y una fracción de crecimiento del 100%, no suelen darse en los tumores sólidos. Los datos experimentales indican que los tumores sólidos crecen siguiendo un modelo en el que en las fases iniciales, cuando el volumen tumoral es pequeño, crecen exponencialmente como la leucemia L210. Posteriormente, el crecimiento se alenta también de forma exponencial, y aumenta el número de células en fase Go. Una importante consecuencia de este tipo de crecimiento es que, en el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes presenta tumores con una baja fracción de crecimiento y, por tanto, con baja sensibilidad a la mayoría de los quimioterapéuticos.

VI.2 Mutación espontánea

En 1979, Goldie y Coldman (Revisado en 11), aplicando conocimiento sobre las mutaciones espontáneas en algunas bacterias que las hacían resistentes a los virus bacteriófagos, formularon una hipótesis matemática sobre la aparición espontánea de resistencia a la quimioterapia antineoplásica. A través de cambios citogenéticos aleatorios, algunas células tumorales podrían mutar y volverse resistentes a ciertos fármacos, sin contacto previo con ellos. Esta capacidad de resistencia se podría transmitir a las células descendientes, de tal forma que la población celular de un tumor en crecimiento no sería homogénea, y coexistirían clonas celulares sensibles y resistentes al tratamiento ⁽¹²⁾. La hipótesis de Goldie y Coldman establece que la tasa de mutación depende de la inestabilidad genética de cada tumor y que tal acontecimiento suele iniciarse antes de que sea clínicamente detectable. El número de células resistentes en un tumor en el momento del diagnóstico se relacionará directamente con su tamaño y su tasa intrínseca de mutación ⁽¹²⁾. Muchos tumores, al ser tratados con quimioterapia, sigue aparentemente las reglas enunciadas por Goldie y Coldman, y Skipper y Simpson-Herren.

VI.3 Causas de la resistencia a la quimioterapia

No existe una definición claramente establecida sobre lo que se considera un tumor “resistente” en la clínica. Algunos autores ⁽¹³⁾ consideran apropiado emplear criterios de valoración de respuesta a la quimioterapia, como los de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽¹⁴⁾, que consideran sensibles los tumores con respuesta completa y resistentes o parcialmente resistentes los demás ^(15,16). Ante esta situación, se puede afirmar que la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón, como la mayoría de los pacientes con tumores sólidos, son resistentes a la actual quimioterapia. Dado que, hasta el momento, no se ha identificado ningún mecanismo que, por sí solo, confiera resistencia a todos los fármacos conocidos ^(9,17), es muy probable que esta resistencia sea de causa multifactorial.

Clasificar las múltiples causas que pueden originar resistencia a la quimioterapia es difícil ^(9,17,18). El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello, es necesario conseguir que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a su blanco molecular, en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia. Tomando como base lo publicado por Lehnert, en 1996 ⁽¹⁸⁾, los factores causantes de la resistencia se podrían clasificar en extracelulares e intracelulares. Ambos grupos no son completamente independientes y pueden influirse entre sí. Tal es el caso del aumento de expresión de algunas proteínas relacionadas con la resistencia a fármacos que se produce en situación de hipoxia por mala vascularización tumoral. La mayor parte de la información sobre mecanismos de resistencia procede de estudios *in vitro* ^(17,19,20).

Aunque cada vez se publican más estudios en la clínica, éstos siguen siendo escasos en comparación con los puramente experimentales, por lo que la verdadera repercusión clínica de estos mecanismos está por determinarse ^(18,20).

VI.3.1 Factores extracelulares

Prácticamente todos los fármacos que se han visto afectados *in vitro* por algún mecanismo de resistencia entran en la célula por difusión pasiva ^(14,15). Por ello, cuanto mayor sea la concentración extracelular del fármaco, mayor será la cantidad que pasa al interior. Entre los factores que pueden alterar la concentración extracelular de un fármaco se encuentran la administración de una dosis insuficiente, la inactivación metabólica, la dificultad en acceder al tumor por una vascularización tumoral alterada, las barreras fisiológicas, como las existentes en el sistema nervioso central y los testículos, zonas conocidas como “santuarios” para la quimioterapia, y también la presencia en el tejido intersticial tumoral de sustancias como el colágeno, que dificultarán la difusión del fármaco ⁽¹⁸⁾.

VI.3.2 Factores Intracelulares

Con independencia de la cinética de crecimiento, ya sea por mutación espontánea o por exposición a los fármacos, la célula tumoral desarrollará una serie de mecanismos de defensa frente a la quimioterapia. Estos mecanismos de resistencia intracelulares son, posiblemente, la causa fundamental del fracaso del tratamiento. Son múltiples y variados ^(23,24), y en general, no se trata de hechos aislados e independientes, sino que han de contemplarse como parte integrante de procesos mucho más complejos, como puede ser el fenómeno de la muerte celular programada o apoptosis ⁽²⁵⁾. Estos mecanismos se podrían dividir en aquellos en los que disminuyen la concentración del fármaco y las propias alteraciones del blanco molecular.

VI.3.2.1 Disminución de la concentración del fármaco al interior de la célula

La reducción en la acumulación intracelular de los fármacos es uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a los antineoplásicos. Esto puede producirse por su expulsión a través de la membrana celular, por secuestros en vesículas citoplasmáticas, por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma o por alteración en el metabolismo intracelular del fármaco ^(18,26).

VI.3.2.2 Expulsión a través de la membrana celular

La expulsión del fármaco fuera de la célula es, probablemente, el mecanismo de resistencia más estudiado y, fundamentalmente, está relacionado con la actuación de determinadas proteínas transportadoras ^(26,27,28). Hasta la actualidad se han descubierto varias proteínas que actúan de esta manera: gp-P (glicoproteína-P), las proteínas MRP 1-6 (Multidrug Resistance-associated Protein 1-5) y BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).

VI.3.2.3 Secuestro en vesículas citoplasmáticas y/o por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma

En líneas celulares resistentes a la doxorrubicina y el cisplatin ⁽²⁹⁾, se han detectado cambios en la distribución intracelular de estos fármacos, por alteraciones en el transporte nuclear y por secuestro intracelular en pseudovesículas citoplasmáticas. Los mecanismos causantes de esta distribución no son conocidos. Es posible que otra proteína, denominada LRP (Lung Resistance Protein) esté implicada ⁽³⁰⁾. Tampoco se descarta que otras proteínas, como gp-P o MRP, también puedan desempeñar un papel en el secuestro vesicular de fármacos.

VI.3.2.4. Alteración en el metabolismo intracelular del fármaco

Una vez en el interior de la célula, los fármacos pueden ser inactivados por oxidación y/o conjugación con glutatión (GSH). Familias de isoenzimas, como las glutatión-S-transferasas (GST), conjugan el glutatión con varios xenobióticos o fármacos, y desempeñan un importante papel en la detoxificación. La sobreexpresión de GST y el aumento del contenido celular de GSH se han asociado a la resistencia a un agente muy importante en el tratamiento del cáncer de pulmón: el cisplatino ⁽³¹⁾, y también las antraciclinas y alquilantes, como el melfalán, la ciclofosfamida, el thiotepa o la carmustina ⁽¹⁸⁾. La conjugación no es suficiente para que la célula expulse los fármacos, ya que el conjugado (GS-X) es más hidrófilo y no puede salir por difusión pasiva. Para ellos, el GS-X necesita las llamadas bombas de GS-X (GS-X pumps). Algunas proteínas transportadoras, como las MRP, pueden actuar como bombas de GS-X ⁽³²⁾. Otra de estas proteínas, la gp-P, parece tener elementos reguladores comunes con la GST- π ⁽³³⁾; se ha descrito un aumento de la expresión de ambas en tumores resistentes y en aquellos con baja actividad proliferativa ⁽³⁴⁾.

VI.3.2.5 Alteraciones del blanco molecular

Las alteraciones de la topoisomerasa II son un ejemplo de cómo una variación en el blanco molecular de los fármacos puede ser causante de resistencia múltiple a fármacos. La resistencia ligada a estas enzimas se ha estudiado ampliamente a escala experimental ⁽³⁵⁾. Algunos autores la denominan resistencia atípica a múltiples fármacos ⁽³⁶⁾, ya que consideran típica o clásica la relacionada con la proteína gp-P. Las topoisomerasas son enzimas muy importantes en el metabolismo del DNA. Entre otras funciones, rompen de forma controlada y posteriormente vuelven a unir las cadenas de nucleótidos²⁴. Existen 2 isoformas de la topoisomerasa II, llamadas alfa y beta⁽³⁷⁾. Estas isoformas presentan una regulación diferente, y sus propiedades y sus funciones también lo son. Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se unen de forma fija a ellas y al DNA, y estabilizan las roturas de éste. Al impedirse el restablecimiento de la integridad del DNA se inicia el proceso de la muerte celular ⁽³⁷⁾. Las alteraciones cuantitativas o cualitativas de la enzima pueden alterar su sensibilidad a sus inhibidores, principalmente de la topo II alfa, dentro de las cuales se han descrito: disminución en la expresión del gen, mutaciones que afectan su actividad y localización alterada de la enzima intracelularmente ^(38,39).

VII. EL FENÓMENO DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS

En la clínica la mayoría de los tumores sólidos, de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples fármacos, con estructura y mecanismos de acción muy diferentes. En su descripción inicial, el fenómeno de resistencia múltiple a fármacos se relacionó con una proteína transportadora de la membrana celular llamada gp-P, pero posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multirresistente, como los ligados a otras proteínas transportadoras, a sistemas detoxificantes, como el del glutatión (GSH) o a las alteraciones de las topo II alfa ^(17,18,20,22-24,40).

VII.1 *Proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos (proteínas MDR)*

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples fármacos o MDR-proteínas, se inicia en 1973, cuando Dano ⁽⁴¹⁾ descubre la expulsión activa de daunomicina en células tumorales resistentes. Estas células habían sido expuestas únicamente a este fármaco, pero presentaban resistencia cruzada con la doxorrubicina y los alcaloides de la vinca. Posteriores estudios describieron el fenotipo celular resistente a múltiples fármacos o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia, mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glicoproteína en la membrana plasmática de células multirresistentes que, por sus características, parecía una buena candidata a ser una bomba de expulsión ⁽⁴²⁾. Pero fue en 1983, cuando Victor Ling y otros investigadores dieron a conocer que el aumento de la expresión de esa proteína de 170 kDa, llamada gp-P, estaba implicado en la resistencia a múltiples fármacos en líneas celulares de mamíferos ⁽⁴³⁾. Aunque los fármacos afectados por las MDR-proteínas presentan diferencias en su estructura y mecanismo de acción, tienen características comunes, como ser compuestos de origen natural, lipofílicos y con un peso molecular de entre 300 y 900 Da, que entran en la célula por difusión pasiva. Estas proteínas se encuentran presentes en numerosos tejidos normales del organismo humano y en los tumores que de ellos se derivan. El hecho de que muchos de estos tejidos tengan funciones secretoras-excretoras (riñón, hígado, epitelio digestivo y respiratorio) hace pensar que las MDR-proteínas podrían desempeñar funciones fisiológicas de protección ante toxinas exógenas ^(44,45). A escala experimental, las proteínas MDR producen resistencia fundamentalmente de 2 formas:

- Actuando como “bombas de expulsión” y disminuyendo la acumulación intracelular de varias sustancias, incluidos numerosos citostáticos ^(20,40). Ejemplos de ello son: gp-P, MRP 1-6 y BCRP, se localizan en la membrana celular y pertenecen a una familia de transportadores conocidos como transportadores ABC (ATP-binding cassette). Los miembros de esta familia están implicados en el transporte activo de numerosas moléculas a través de la membrana celular.
- Alterando la distribución intracelular de algunos fármacos ⁽⁴⁶⁾. Fundamentalmente se ha asociado a la LRP, aunque también la MRP y la gp-P.

VII.2 *Glicoproteína P (pg-P)*

La resistencia ligada a gp-P, por ser ésta la primera proteína MDR descubierta, es el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos estudiado más extensamente. Por ello, se conoce también como MDR clásica o típica ⁽³⁶⁾. Al gen que codifica la gp-P se denomina *mdr-1*, y se localiza en el cromosoma 7. La gp-P es una glicoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kDa; por este motivo, se denomina también proteína P-170 ⁽²²⁾15. La gp-P actúa como una bomba de expulsión ATP-dependiente, y reduce la acumulación intracelular de varias sustancias. Se expresa normalmente en el colon, el intestino delgado, las suprarrenales, el riñón y el hígado, y se piensa que su función puede ser aumentar la excreción y limitar la absorción de elementos nocivos para el organismo. Se han detectado valores elevados de gp-P en el endotelio capilar del cerebro y los testículos, así como en la barrera placentaria ⁽²⁴⁾, el músculo, el pulmón y el páncreas ⁽⁴⁷⁾. La expresión de gp-P determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales, como antraciclinas, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas y taxanos, entre otros. También sirven de sustrato a la gp-P otros fármacos o compuestos exógenos, como los bloqueadores de los canales del calcio (verapamil), la digoxina, los opiáceos, los hidrocarburos aromáticos, los complejos sintéticos, como el 99mTc-sestamibi, la rhodamina-123 o antivirales como los inhibidores de la proteasa ^(22,24). Se ha detectado la gp-P en varias neoplasias hematológicas y sólidas ⁽⁴⁸⁾, y puede aparecer de novo o ser inducida por el tratamiento con quimioterapia, hormonoterapia ⁽⁴⁹⁾ o radioterapia ⁽⁵⁰⁾.

VII.3 *MRP (Multidrug Resistance-associated Protein)*

La MRP es, en realidad, una familia de varios transportadores celulares ⁽³²⁾. Las MRP se localizan en la membrana plasmática, y forman parte, como la gp-P, de los transportadores ABC, pero también en el retículo endoplasmático, de lo que se infiere que pueden actuar tanto en la expulsión de fármacos fuera de la célula como en el secuestro intracelular de éstas en las vesículas citoplasmáticas ⁽²⁴⁾. Las MRP son capaces de transportar aniones orgánicos y fármacos neutros, conjugados o no, con sustancias como el glutatión, los glucoronatos y los sulfatos. Se cree que algunos sistemas de expulsión de

conjugados de glutatión (GS-X pumps) pueden ser proteínas de la familia MRP ⁽⁵¹⁾; tal es el caso de las bombas GS-X que expulsan metotrexato (anión orgánico), que se han relacionado con MRP-1, MRP-2 y MRP-3 ⁽⁵²⁾. Por este mismo sistema, también podrían estar relacionadas con la expulsión de toxinas naturales, sales de metales pesados, como el arsénico, y con la resistencia a pequeñas moléculas, como el cisplatino ^(15,16).

MRP-1

Ha sido la más estudiada del grupo. Es una proteína de 190 kDa codificada por el gen MRP1 que se localiza en el cromosoma 16. Fue descubierta por Cole et al a partir de una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente (H69AR) que no expresaba gp-P ⁽⁵³⁾. La mayoría de trabajos que hacen referencia a MRP, sin especificar su tipo, se refieren a MRP-1. Su espectro de resistencia es similar pero no idéntico al de gp-P, y la ciclosporina A no puede revertirla ⁽⁵⁴⁾. El transporte de taxanos por MRP-1 es mucho menor que por gp-P, y su afinidad para aniones orgánicos es mucho mayor ⁽³²⁾. Aunque algunos autores niegan su relación con la resistencia al cisplatino ⁽³²⁾, otros sí la relacionan con la falta de respuesta a este fármaco ⁽⁶⁵⁾. La distribución de MRP-1 en tejidos normales es bastante similar a la de gp-P ⁽⁴⁷⁾, pero MRP-1 se expresa de forma más importante en el tejido pulmonar normal y, al contrario que la gp-P, se expresa poco en el riñón ^(53, 56) y nada en el hígado ⁽³²⁾. También se encuentra en el tiroides y la próstata ⁽⁴⁷⁾. Se han detectado valores elevados de MRP-1 en células mononucleares periféricas, macrófagos alveolares ⁽⁵⁹⁾ y linfocitos infiltrantes de tumores ⁽⁵⁶⁾. La MRP-1 es el mayor transportador de leucotrieno C4 ⁽⁶⁰⁾. Los leucotrienos son unos potentes mediadores proinflamatorios que aparecen en la fase tardía de la reactividad asmática ⁽⁶⁰⁾. Esto y su detección, junto con la gp-P en el interior de las células dendríticas, hacen suponer que ambas desempeñan un papel importante en la respuesta inmune ⁽³⁴⁾. La localización celular de MRP-1 difiere de la de la gp-P: mientras que ésta se localiza en la membrana apical del epitelio, la MRP-1 lo hace en la membrana basolateral, por lo que se supone que expulsa sus sustratos a un compartimiento diferente que la gp-P, el intersticio. Esto puede significar un factor de protección importante, por ejemplo, para las células germinales en los túbulos testiculares, o para prevenir la entrada de tóxicos en el líquido cefalorraquídeo a través de los plexos coroides ⁽³²⁾.

MRP-2

Es la principal responsable del transporte de bilirrubina hacia los canalículos biliares, su defecto produce el llamado síndrome de Dubin-Johnson. En cultivos celulares, su espectro de resistencia es similar al de la MRP-1, pero con una importante diferencia: la MRP-2 induce resistencia al cisplatino al eliminarlo de la célula conjugado con glutatión (GSH), cosa nunca vista en células que expresan MRP-1. Junto con el clásico fármaco implicado en la MDR, también se ha detectado resistencia al irinotecán y la mitoxantrona ⁽³²⁾. Al igual que para la MRP-1, la presencia de glutatión parece necesaria para la actuación de la MRP-2, ya sea mediante conjugación con ésta, como del cisplatino, o bien de forma no conjugada, como con las antraciclinas y los alcaloides de la vinca ^(32,61).

MRP-3

La función fisiológica de la MRP-3 no se conoce: se expresa en la membrana basolateral de los hepatocitos y también en la corteza suprarrenal⁽³²⁾. Al igual que la MRP-1, parece conferir una fuerte resistencia a la doxorubicina, en líneas celulares del cáncer de pulmón, y en menor grado también se relaciona con resistencia a la vincristina, el etopósido y el cisplatino ⁽⁵⁸⁾, y con la exposición corta al metotrexato ⁽³²⁾. Se cree que la MRP-3 y la MRP-1 (y en cambio no la MRP-2) pueden ser causa de resistencia a múltiples fármacos en el cáncer de pulmón, y que particularmente la MRP-3 contribuye a la resistencia intrínseca del cáncer de pulmón de células no pequeñas a la quimioterapia ^(58,61). Se ha detectado la expresión significativa de MRP-3 en el tejido pulmonar normal y tumoral de pacientes tratados con cisplatino. También se ha encontrado un rápido aumento de la expresión en células mononucleares periféricas, en las primeras 24 h tras la administración de carboplatino, en pacientes con cáncer de pulmón sin tratamiento quimioterápico previo ⁽⁶²⁾.

MRP-4

Su aumento se asocia a la resistencia a compuestos antivirales contra el VIH (PMEA o AZTMP); por esta resistencia a los análogos de los nucleótidos, se cree que puede desempeñar un papel en la resistencia a antineoplásicos como la 6-mercaptopurina o la tioguanina ^(32,61). No existen pruebas que confirmen la sospecha de la participación de estas proteínas en la resistencia a la quimioterapia de muchos tumores⁽⁶⁵⁾. Su función fisiológica es desconocida ^(31,61).

MRP-5

Esta proteína transporta conjugados de glutatión y parece, al igual que la MRP-4, ser una bomba de expulsión de nucleótidos. Se desconoce su función fisiológica ^(32,61).

MRP-6

Su fisiología y papel en resistencia son desconocidos. Se detectan valores elevados en el hígado y el riñón, y parece que suele expresarse junto con la MRP-1 ^(32,61).

VII.4 LRP (*Lung Resistance-related Protein*)

La LRP es una proteína de 110 kDa descubierta a partir de una línea celular de cáncer de pulmón con MDR no ligada a la gp-P70. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 16, cercano al de la MRP-1 ⁽⁶³⁾. La LRP aparece como un episodio precoz en la selección de células multirresistentes. En líneas celulares seleccionadas para resistencia a numerosos fármacos se demostró expresión de LRP cuando los valores de resistencia eran bajos. La expresión de LRP declinaba con valores mayores de resistencia, a la vez que aumentaba la expresión de gp-P ⁽²⁹⁾. Se conoce también como MVP (major vault protein), porque constituye el componente proteínico mayor de unos organelos celulares llamados vaults ⁽⁵⁹⁾. Los vaults son ribonucleoproteínas con una compleja estructura en forma de barril ⁽⁶⁴⁾. Los vaults tienen una composición y una estructura casi idénticas en especies filogenéticamente tan alejadas como las amebas y los humanos, lo que parece indicar que su función es esencial para las células eucariotas. La mayoría de los vaults se encuentran en el citoplasma, probablemente en asociación con vesículas citoplasmáticas, y una pequeña parte en la membrana nuclear, concretamente en los complejos del poro nuclear o NPC (nuclear pore complex) ⁽⁶⁵⁾. Se dispone de pruebas de que los vaults son en realidad las unidades transportadoras de los NPC, y están implicados en el transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma de una gran variedad de sustratos ⁽⁶⁶⁾. No se conoce exactamente cómo la LRP puede afectar a la quimioterapia, aunque se especula acerca de una probable regulación del transporte de fármacos entre el núcleo y el citoplasma, y entre éste y el interior de vesículas citoplasmáticas ⁽⁶⁴⁾. La transferencia del gen de la LRP sola no es suficiente para conferir resistencia a fármacos, y es posible que para esto se necesite el vault completo. Se ha detectado LRP en el riñón, la glándula suprarrenal, el corazón, el músculo, el tiroides, la próstata, la médula ósea y los testículos ^(47,67).

En los pulmones se expresa de forma más intensa en los macrófagos alveolares que en las células epiteliales. En tejidos tumorales, su expresión parece guardar una relación inversa con la quimiosensibilidad de éstos ⁽⁶⁸⁾. La expresión de LRP se relaciona *in vitro* con un espectro de resistencia múltiple, que incluye fármacos de los considerados “clásicos” en MDR, y otras que no, como el melfalán y las sales de platino ⁽⁶⁹⁾. La expre-

sión de LRP parece aumentar en situaciones de hipoxia ⁽¹⁹⁾. Se ha demostrado, de forma clara, la implicación de LRP en la resistencia a la adriamicina, la vincristina, el VP-16 y el taxol, y en el transporte de adriamicina, entre el núcleo y el citoplasma, en la línea celular de carcinoma de colon humano SW-620 ⁽⁷⁰⁾. En líneas celulares no seleccionadas de cáncer de pulmón de células no pequeñas, se ha encontrado una correlación entre la LRP y la resistencia al cisplatino, y por mecanismos diferentes a otras formas de resistencia a este fármaco, como pueden ser los sistemas de expulsión de conjugados con el glutatión (GS-X pumps).

VII.5 BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*)

La BCRP es la proteína MDR de descubrimiento más reciente; se aisló en líneas celulares multirresistentes seleccionadas por exposición a la mitoxantrona. También se denomina MXP, ABCP o ABCG2 ⁽⁷¹⁻⁷³⁾. La BCRP es un “medio-transportador” ABC, que necesita estar en forma de dímero o multímero para trasladar sustratos de forma eficiente a través de la membrana celular. Su expresión confiere una elevada resistencia a las antraciclinas (mitoxantrona, daunorrubicina, doxorrubicina) y a los inhibidores de la topoisomerasa I; de hecho, es un eficiente transportador de topotecán, pero no parece afectar a los taxanos, a los alcaloides de la vinca ni al cisplatino ^(74,75). La BCRP presenta una baja expresión en el tejido pulmonar, y se localiza fundamentalmente en la capa epitelial, las glándulas seromucinosas y el endotelio capilar ⁽⁴⁰⁾. Se ha detectado expresión de BCRP en leucemias agudas ⁽⁷⁶⁾ y en algunos tumores sólidos, como el cáncer de pulmón ⁽⁷⁷⁾. Se dispone de muy pocos datos sobre el significado clínico de esta nueva proteína MDR. Por inmunohistoquímica, la BCRP está presente en vasos y en el epitelio mamario normal, pero no en las células tumorales de pacientes con neoplasia de mama, y sin diferencias de expresión entre las pacientes expuestas o no a las antraciclinas. Por métodos más sensibles, como la RT-PCR, la expresión fue muy variable y sin relación con la respuesta ni la supervivencia ⁽⁷⁸⁾.

VIII. RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASAS II

VIII.1 *Topoisomerasas*

Las topoisomerasas (topos) son enzimas esenciales para el metabolismo del DNA, en donde ellas ajustan el superenrollamiento del DNA, una clave crucial para los procesos celulares de transcripción y duplicación. Su mecanismo catalítico crea muescas (tipo I) o cortes (tipo II) transitorios en el DNA de doble cadena, permitiendo con esto que el DNA se convierta en isómeros topológicos. Los humanos poseen dos tipos de topos, sin embargo ambos tipos utilizan un mecanismo enzimático diferente. Tanto las topoisomerasas del tipo I como del tipo II han sido identificadas como importantes blancos clínicos para varios fármacos quimioterapéuticos y estos son componentes centrales en algunos regímenes terapéuticos.

VIII.2 *Topoisomerasas tipo I (topo I)*

Las células de mamífero tienen una topoisomerasa tipo I (topo I), una proteína monomérica de 100 kDa que es capaz de relajar positivamente y negativamente los superenrollamientos del DNA sin la presencia de energía⁽⁷⁹⁾. La topo I se expresa en las células en un nivel constante, no importando la fase del ciclo celular⁽⁸⁰⁾. Dado el papel que tiene esa proteína como reguladora, la actividad de esta enzima es sensible a modificaciones post-traduccionales. Reportes por separado han descrito que existe una reducción o una estimulación de la actividad *in vitro* cuando la topo I es fosforilada por una tirosina proteína cinasa y por la caseína cinasa II respectivamente^(81,82). La poli(ADP)ribosilación de la topo I ha mostrado una disminución de la actividad de la enzima. La enzima funciona vía un intermediario covalente, denominado “complejo de corte”, en donde la enzima se ha unido de manera fuerte a una de las hebras del DNA en el esqueleto de fosfato por el ataque nucleofílico de un residuo de tirosina (Tyr 723), formando un enlace covalente en el extremo 3' del hueco y deja libre el grupo hidroxilo del extremo 5'⁽⁸³⁾.

La estructura cristalográfica de la topo I eucariote unida a un oligonucleótido se definió recientemente, permitiendo con este modelo establecer el mecanismo de acción de la enzima (Figura 2).

VIII.3 Topoisomerasas tipo II (topos II)

Las células de mamíferos tienen dos isoformas de topoisomerasas tipo II (topo II). La isoforma alfa y la beta, ambas son dependientes de ATP. La topo II alfa es una enzima ubicua en todos los tipos celulares, en donde es esencial para el desenrollamiento de las cadenas de DNA entrelazadas que se presentan durante los procesos de duplicación y para la relajación del DNA durante la transcripción, mientras que la topo II beta no es esencial y su papel esta muy poco definido ⁽⁸⁴⁾. Las topo II tienen la función de hacer un doble corte en una doble cadena de DNA y pasar otra doble cadena de DNA por este corte y después religar el sitio donde se hizo el corte (Figura 2). La topo II alfa actúa como un homodímero, con tres regiones catalíticas en cada subunidad. De forma análoga a la topo I, la topo II usa dos residuos de tirosina, uno en cada monómero, para llevar a cabo el corte en la doble cadena de DNA y formar el complejo de corte. Sin embargo, a diferencia de la topo I, los residuos de tirosina se unen al extremo 5' del corte, dejando libre el grupo hidroxilo del extremo 3' ⁽⁸⁴⁾.

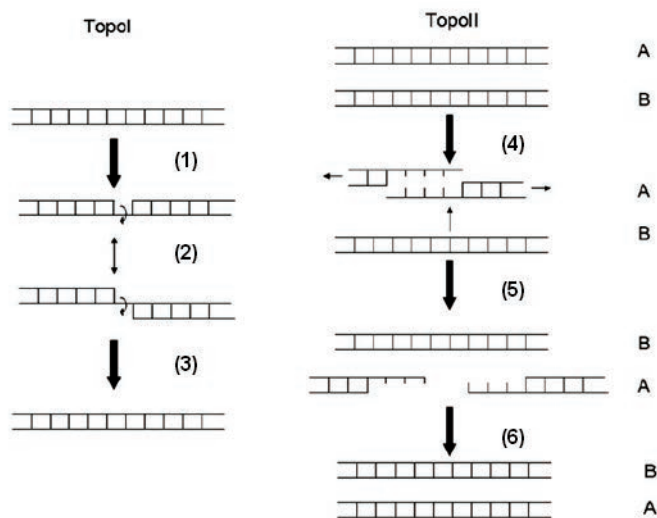


Figura 2. Diagrama esquemático de la acción de las topoisomerasas. Las topoisomerasas tipo I crean un hueco o muesca en una de las hebras de DNA ⁽¹⁾. El DNA puede ser desenrollado al girar alrededor del enlace fosfodiéster restante y remover de esta forma los superenrollamientos ⁽²⁾. La enzima religa los rompimientos para restaurar la integridad del DNA ⁽³⁾. Las topoisomerasas tipo II pasan una hebra de DNA a través de un corte en otra hebra. Inicialmente la enzima crea un corte de cuatro pares de bases en la doble cadena en la hebra A ⁽⁴⁾. Las dos mitades de la hebra A se apartan y la hebra B pasa a través de este corte ⁽⁵⁾. La enzima religa el corte en la doble de la hebra A ⁽⁶⁾.

VIII.4 Topoisomerasa II alfa

VIII.4.1 Gen de topo II alfa

El gen de la topo II alfa ha sido clonado y secuenciado de varios organismos eucariontes como levaduras, *Drosophila*, rata, ratón, hámster y en humano. En las células humanas, se ha identificado al gen de la topo II alfa ⁽⁸⁵⁾. Este gen se localiza en el cromosoma 17q21-22 y contiene 35 exones distribuidos en 30 kb ⁽⁸⁶⁾. El gen de topo II alfa transcribe un RNA mensajero de 4593 nucleótidos, el cual produce una proteína de 1,531 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa ⁽⁸⁶⁾(Figura 3).

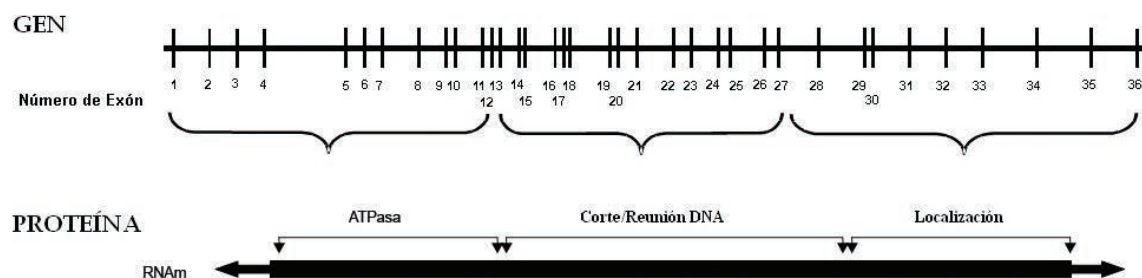


Figura 3. Gen y proteína de topo II alfa. El gen de topo II alfa consta de 35 exones y su tamaño es de 30 kb (Arriba). La proteína de topo II alfa se divide en tres dominios: de ATPasa, Corte/Reunión del DNA y de localización, su tamaño es de 1,531 aa dando un peso de 170 kDa (Abajo).

VIII.4.2 Regulación de la expresión del gen de topoisomerasa II alfa

La expresión de la topo II alfa se encuentra íntimamente relacionada con la progresión del ciclo celular. Los niveles de esta enzima aumentan durante los periodos de crecimiento celular. Esta isoforma esta asociada con los cromosomas durante la mitosis ^(87, 88-91) y es la responsable de llevar a cabo el papel de las topo II durante la replicación del DNA y en la mitosis ^(88,90,91-94,95). En contraste, la expresión de la isoforma beta es independiente del estadio de proliferación, por lo que permanece sin cambios su expresión durante el ciclo celular, y la enzima se disocia de los cromosomas durante la mitosis ^(87,88,94,96). Mientras que las células pueden sobrevivir sin la presencia de la topo II beta, esta isoforma no puede compensar la pérdida de la topo II alfa ^(96,97,98).

La expresión de la topo II alfa se enciende cuando la célula progresa de la fase G1 a la fase S, con un nivel máximo de expresión en G2/M. Esta fluctuación se atribuye a la variación de los niveles de mRNA, que tienen un pico de concentración en la fase S tardía y G2/M, y que aumentan considerablemente con respecto a la fase G1 ⁽⁹⁹⁾. Estas fluctuaciones en la concentración de la topo II alfa se deben principalmente a que la célula necesita de la actividad de esta enzima para poder disgregar a las cromátidas hermanas, así como los diferentes problemas topológicos que se han generado en el DNA después de su replicación en la fase S. Después de la mitosis la mayor parte de la topo II alfa es degradada y de esta manera su actividad se ve disminuida ⁽⁹⁹⁾.

La secuencia del extremo 5' del gen de topo II alfa en humanos ha sido aislada y analizada, así como también la actividad basal del promotor ⁽¹⁰⁰⁾. Los elementos reguladores más importantes en el promotor de topo II alfa se muestran en la figura 4.

El promotor de la topo II alfa humana tiene cinco cajas CCAAT funcionales (ICB1-5) y dos cajas GC ⁽¹⁰¹⁾. Las cajas CCAAT están delimitadas por al menos un elemento funcional importante del promotor. En el caso del promotor de la topo II alfa humana, las cajas ICB1 e ICB5 son delimitadas por GC1 y GC2 respectivamente. Las cajas GC son los elementos más frecuentes en los promotores y tienden a estar presentes en múltiples copias. En los promotores donde están presentes múltiples cajas GC, es común que cada una de estas cajas tenga una función diferente, de acuerdo a su posición con respecto al punto de inicio de la transcripción y otros elementos que se encuentren cercanos.

En el promotor de la topo II alfa, GC1 esta contenido en el promotor mínimo ⁽¹⁰¹⁾, mientras que GC2 se encuentra distal a esta región. Las mutaciones en GC1 han mostrado que no hay una disminución en la actividad del promotor de la topo II alfa, sin embargo en células resistentes una mutación en GC1 ha mostrado que aumenta la actividad del promotor ⁽⁹⁴⁾.

Aunque algunos promotores tienen múltiples cajas GC, se ha demostrado que un solo sitio de unión a Sp1 es suficiente para estimular la actividad del promotor ⁽¹⁰²⁾. Sp1 se conoce comúnmente como un activador transcripcional y también se ha mostrado que es capaz de regular positivamente la transcripción en una gran variedad de promotores incluido el de topo II alfa ⁽¹⁰³⁾. La activación de la transcripción mediada por Sp1 depende de tres estructuras de dedos de zinc responsables de la unión al DNA y al menos de uno de las dos regiones ricas en Q (o motivos de activación) que son requeridas por las interacciones proteína/proteína y la transactivación ⁽¹⁰⁴⁾.

También se encuentran elementos CCAAT en una orientación invertida, denominados ICBs ("Inverted CCAAT Box"), numeradas del 1 al 5 a partir del sitio de inicio de la transcripción ^(101,105). Estos factores están relacionados con la regulación de la expresión del gen de topo II alfa ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾. El ICB1 está relacionado con la represión en la fase G1 del ciclo celular, mismo papel que desempeña la ICB2, aunque este se da en condiciones de confluencia celular ⁽¹⁰⁸⁾. Para ICB3, por ejemplo, existen reportes que se contraponen ya que algunos señalan que su papel es regular negativamente y otros que es lo contrario, es decir, positivamente. En ICB4 e ICB5 se ha señalado que son factores importantes que aumentan la transcripción del gen de topo II alfa.

Existen además factores que están relacionados en la regulación del gen de topo II alfa, uno de estos es el NF-Y, mismo que se une a los elementos ICB's ^(107,109).

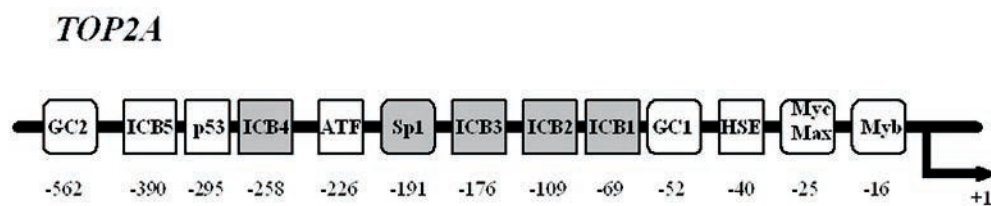


Figura 4. Esquema de la región del promotor del gen de topo II alfa en humanos (TOP2A). En la figura se muestran los diferentes reguladores: cajas ricas en GC (GC1 y GC2), elementos ICEs (1-5), Sp1, ras y myb, p53, así como Myc y Max.

Para el oncogén c-myb también se ha demostrado que actúa como transactivador del gen de topo II alfa en células de leucemia humana ^(94,111).

Uno de los factores más importantes de regulación transcripcional del promotor de topo II alfa es p53 ⁽¹¹⁴⁾. La proteína p53 es importante en la regulación del ciclo celular y para el mantenimiento de la estabilidad genómica, por lo que la regulación precisa de los niveles de expresión del gen de topo II alfa por p53, es uno de varios factores que aumentan la estabilidad genómica.

La proteína ICBP90 también se relaciona con la regulación del gen de topo II alfa ⁽¹¹²⁾. Tomando en cuenta que NF-Y puede tener un efecto inhibitorio y que los elementos ICB's pueden tener un papel de activación, el desplazamiento de NF-Y por ICBP90 puede contribuir al aumento de la expresión del gen de topo II alfa por varios mecanismos ⁽¹¹³⁾. De manera interesante se ha observado que ICB90 y Rb se asocian en un mismo complejo proteico, sugiriendo con esto que ICBP90 puede estar relacionada en la regulación de la transición de la fase G1 a S ^(113,115).

La regulación de la expresión del gen de topo II alfa por varios elementos muestra la importancia que tiene en la vida de la célula. La alteración en la expresión de la topo II alfa se ha correlacionado con la respuesta a la quimioterapia en líneas celulares y tumores, en donde altos niveles de expresión confieren una sensibilidad a los fármacos, mientras que bajos niveles confieren resistencia ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾.

VIII.4.3 La proteína de topo II alfa

El producto de este gen se estructura como un homodímero (Figura 5). Cada subunidad contiene tres dominios funcionales: el dominio NH₂-proximal que corresponde aproximadamente a los primeros 450 aminoácidos y contiene tres motivos conservados de unión a nucleótidos (NBM: Nucleotide-Binding Motifs); el dominio central que comprende alrededor de 750 aminoácidos y contiene el residuo de tirosina (Tyr804) donde la proteína une al DNA de forma covalente⁽¹²⁰⁾. Una región de dedos de leucina que es importante para la interacción proteína-proteína también se encuentra en esta región de la topo II alfa ⁽¹²⁰⁾. El dominio COOH-terminal que son aproximadamente 331 aminoácidos y contiene dos sitios de señales de localización nuclear (SLN) ⁽¹²¹⁾ y dos de exportación nuclear (SEN)^(122,123,124). También es conocido que la región carboxilo de la topo II alfa no es esencial para la actividad catalítica de esta enzima ^(125,126). Sin embargo en esta región se encuentran localizados los sitios de fosforilación de la enzima, y en varios reportes se ha mostrado que la fosforilación puede regular la actividad catalítica de esta enzima (Figura 5).

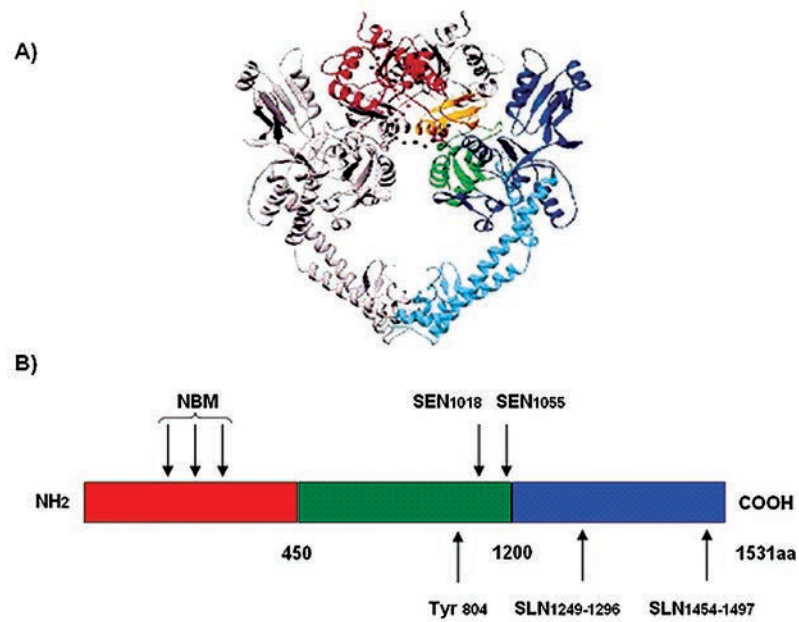


Figura 5. Estructura de la proteína topo II alfa. A) Modelo tridimensional de la topo II alfa de levadura. Se observa el homodímero en su estructura cuaternaria. Los colores rojo, verde y azul, corresponden a las diferentes regiones de la enzima señaladas en B). B) La topo II alfa tiene tres dominios funcionales. En el dominio de ATPasa se encuentran 3 aminoácidos denominados NBM (Nucleotide Binding Motifs), en el domino central en donde se lleva a cabo corte y la religación de las hebras de DNA por la Tyr804, y por último el dominio COOH, en donde se encuentran las señales de localización nuclear (SLN) y de exportación nuclear (SEN).

VIII.4.4 Distribución Intracelular

Existe una considerable diversidad de opiniones acerca de la localización intranuclear de la topo II alfa tanto en interfase como en mitosis. En las células interfásicas, algunos reportes indican que la topo II alfa se encuentra en el nucleoplasma y en el nucleólo ^(127,128), mientras que otros sugieren que la topo II alfa no se encuentra en el nucleólo ^(129,130). En la fase de mitosis, la topo II alfa se ha encontrado distribuida a lo largo de los brazos de los cromosomas ^(130,131) o concentrada en las estructuras axiales de los cromosomas mitóticos ⁽¹³²⁾. Además de su presencia en los brazos de los cromosomas, varios estudios mostraron que la topo II alfa se concentra en los centrómeros de los cromosomas mitóticos ⁽¹³¹⁻¹³⁴⁾. La distribución a lo largo de los brazos de los cromosomas y de los centrómeros es consistente con el papel enzimático y/o estructural de la topo II alfa en la condensación de los cromosomas y en la segregación de los mismos ⁽¹³⁵⁾, es decir la topo II alfa esta ubicada en los sitios en donde será requerida para poder resolver los problemas topológicos del DNA, como en la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.

VIII.4.5 Señales de localización nuclear en topo II alfa

Como en otras enzimas nucleares, la topo II alfa contiene SLN que la dirigen al núcleo después de su síntesis en el citoplasma. Las SLN son típicamente pequeños agrupamientos de aminoácidos básicos, normalmente precedidos por un aminoácido básico o un residuo de prolina ⁽³⁹⁾. Sin embargo, una SLN puede también consistir de agrupamientos bipartitas de aminoácidos básicos separados por un región de aproximadamente diez aminoácidos, normalmente flanqueados por un aminoácidos neutro o ácido ⁽³⁹⁾. La definición convencional de SLN bipartita es inadecuada para las secuencias en topo II alfa que se ha descrito en otras enzimas. Las dos señales de localización nuclear, que son bipartitas, se encuentran en la región COOH- terminal de la topo II alfa, una de ellas se encuentra localizada entre los aminoácidos 1454 y 1497 (SLN1454-1497) tiene un espaciador de 21 aminoácidos entre los dos dominios básicos y es fuertemente funcional. La otra señal de localización se sitúa entre los aminoácidos 1259 y 1296 (SLN1249-1296), su funcionalidad es moderada y contiene múltiples SLN bipartitas potenciales que la sobrelapan y presentan un espaciador de 4 a 24 aminoácidos ⁽²⁸⁾. Además, poco se sabe acerca de los mecanismos que regulan el transporte de la topo II alfa del citoplasma al núcleo.

La topo II alfa es traslocada al núcleo por la interacción de la SLN con la importina α la cual se une a la importina β y es dirigida al núcleo en donde el complejo se disocia después de interaccionar con Ran-GTP (124).

VIII.4.6 Modificaciones postraduccionales

Algunos estudios han identificado sitios de fosforilación en la topo II alfa, principalmente en la región COOH-terminal. Consistente con la función fisiológica de topo II alfa, la fosforilación de varios residuos es regulada durante el ciclo celular (Figura 6) ^(136,137). Aunque se ha demostrado que varias cinasas fosforilan a la topo II alfa, la cinasa de caseína II (CKII) ha sido mostrada como la cinasa que mayor interacción tiene con la proteína y que fosforila varios residuos, incluyendo Ser₁₃₄₂, Ser₁₃₆₇, Ser₁₄₆₉, y Ser₁₅₂₄ en la topo II alfa humana ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁵⁾. Además de la CKII, se ha demostrado que la proteína cinasa C (PKC) fosforila la Ser₂₉ ⁽¹³⁶⁾, y la p34/cdc2 fosforila los sitios Ser₁₂₁₂, Ser₁₂₄₆, Ser₁₃₅₃, Ser₁₃₆₀ y Ser₁₃₉₂ ⁽¹³⁷⁾ (Figura 6A). La identificación de la mayoría de estos sitios de fosforilación se basó en estudios *in vitro* utilizando cinasas purificadas. Sin embargo, la fosforilación de estos sitios *in vivo* se confirmó por el análisis de fosfopéptidos generados por fosforilaciones *in vivo* e *in vitro* ^(136,137). Aunque la CKII es capaz de regular la actividad de la topo II alfa en mamíferos, el mecanismo por el cual ocurre esto, parece estar relacionado con la estabilización de la topo II alfa por la fosforilación ^(146,147). Por otro lado se ha sugerido que las fosforilaciones en la región COOH-terminal no son importantes para la actividad de la topo II alfa, ya que una delección o una mutación en esta región, no inactiva a la enzima ⁽¹⁴⁶⁾. Sin embargo, un estudio mostró que la fosforilación en la Ser₁₁₀₆, aminoácido cercano a la región COOH-terminal, regula la actividad enzimática de topo II alfa, ya que una mutación en este sitio se traduce en una disminución en la actividad de decatenación del DNA y también en el número de complejos fármaco-DNA-enzima ⁽¹⁴⁸⁾.

También se ha propuesto que la fosforilación en estos sitios puede ser importante para la localización subcelular de topo II alfa ⁽¹⁴⁸⁾. La fosforilación en la Ser₂₉ no afecta la actividad de ATPasa de la topo II alfa, la cual se localiza en la región NH2-terminal y que es requerida para el paso final de religación en la reacción enzimática ^(136,149).

Los niveles de la fosforilación de la topo II alfa presenta variaciones durante el ciclo celular, siendo muy bajos en células en reposo y muy elevados en células que se encuentran en las fases G₂/M ^(136,150) (Figura 6B).

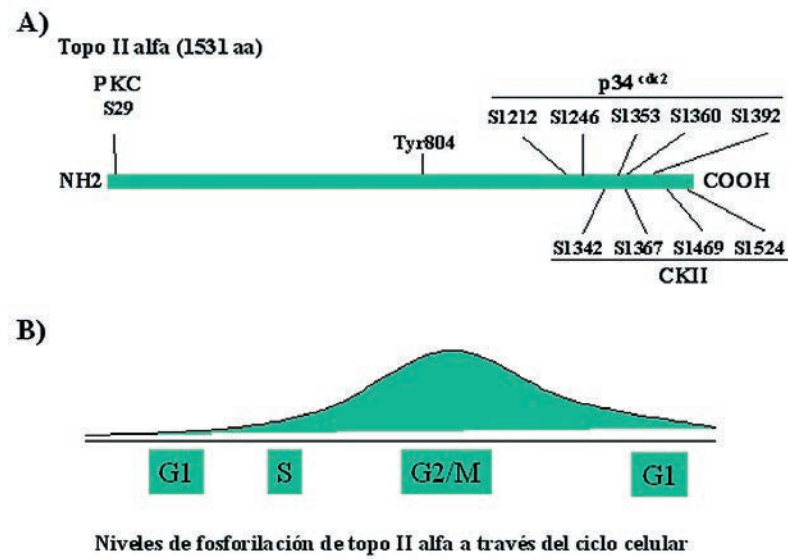


Figura 6. Sitios y niveles de fosforilación en la topo II alfa. A) Sitios de fosforilación en la topo II alfa. Se señalan las cinasas que fosforilan estos sitios. B) Variaciones en los niveles de la fosforilación de la topo II alfa durante el ciclo, teniendo su pico de hiperfosforilación en G2/M.

En algunos modelos celulares, la sensibilidad a fármacos mediada por la topo II alfa parece estar influenciada por los niveles de fosforilación. Sin embargo, en otros modelos, las modificaciones por la fosforilaciones no parecen tener efectos ⁽¹⁵⁰⁾. También se ha sugerido que la actividad catalítica de la topo II alfa puede ser regulada por la poli-(ADP-ribosilación). Experimentos *in vitro* han mostrado que la topo II alfa purificada de timo es sustrato de la poli-(ADP-ribosa) sintasa y que ambas modificaciones inhiben la actividad catalítica de esta enzima ⁽¹⁵¹⁾.

La actividad de la topo II alfa es regulada por modificaciones postraduccionales, principalmente por la fosforilación. Esta enzima es fosforilada principalmente en el extremo COOH- terminal. En unión, la expresión y la activación de la topo II alfa alcanzan su nivel máximo de la fase S a la fase G2/M, en donde la enzima es muy importante para la transición por estas fases del ciclo celular.

VIII.4.7 Ciclo catalítico de las topo II

Por medio de la actividad catalítica de la topo II alfa es posible remover la tensión helicoidal negativa o positiva del DNA, así como nudos intramoleculares en el DNA (moléculas superenrolladas) o bien intermoleculares (moléculas catenadas). Un ciclo catalítico completo de la topo II se presenta en la figura 7. Varios pasos se presentan entre la interacción de la enzima y el DNA para llevar a cabo su ciclo completo:

- 1) La topo II se une a dos segmentos de DNA para iniciar un ciclo catalítico ^(152,153).
- 2) En la presencia de una cation divalente ⁽¹⁵⁴⁾, cada una de las dos subunidades de la enzima corta una de las hebras de la doble hélice ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾. Los dos enlaces escindibles están localizados cuatro pares de bases apartados uno de otro en el surco mayor. De esta manera, los cortes generan moléculas de DNA con extremos cohesivos de cuatro pares de bases de extensión en su extremo 5' ^(155,156). Esta reacción es reversible y la enzima establece un equilibrio entre el corte y la religación del DNA.
- 3) La topo II une dos moléculas de ATP y la enzima tiene un cambio conformacional que causa el paso del segmento de DNA intacto a través de la doble hélice cortada ^(158,159). El paso de la hebra de DNA parece ser más rápido si se hidroliza una de las dos moléculas de ATP ⁽¹⁶⁰⁾. El DNA transportado es pasado a una cavidad central de la topo II a través de una puerta en el extremo amino. La puerta se cierra y la enzima forma una tenaza proteica sobre el DNA ^(161,162).
- 4) Después de la traslocación del DNA, la topo II resella el corte en el la hebra de DNA, y la enzima establece una vez más en equilibrio de corte-religación del DNA ⁽¹⁶¹⁾.
- 5) La topo II hidroliza la segunda molécula de ATP, lo cual abre la puerta en el extremo carboxilo y esto permite que el segmento de DNA transportado sea liberado ^(158,161,162).
- 6) Finalmente, la enzima regresa a su conformación original y recupera su conformación nativa para comenzar un nuevo ciclo catalítico ^(158,161).

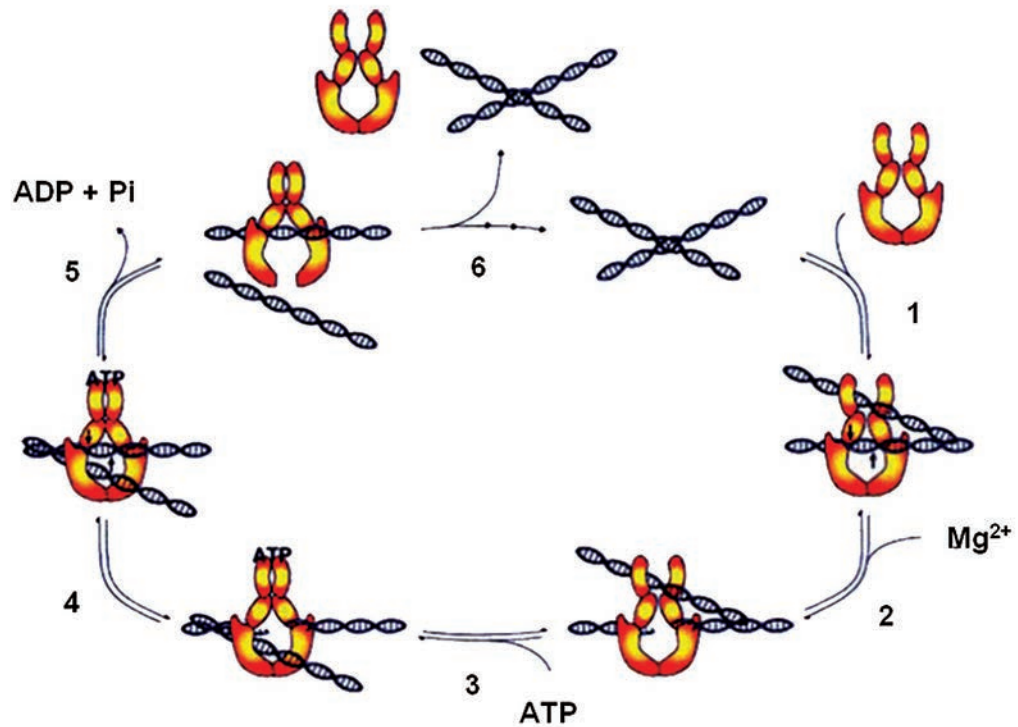


Figura 7. Ciclo catalítico de las topo II. Se muestra un ciclo catalítico completo como una serie de seis pasos. 1) Unión de la topo II al DNA; 2) Equilibrio de corte/religación del DNA previo al paso de la hebra; 3) Unión de ATP y paso de la hebra de DNA; 4) Equilibrio de corte/religación del DNA después del paso de la hebra; 5) Hidrólisis de ATP y la apertura de la compuerta; 6) Liberación del DNA y la enzima para un nuevo ciclo catalítico.

En la reacción de corte de la hebra de DNA por la topo II alfa, el oxígeno de la Tyr₈₀₄ ataca al fósforo del DNA, formando un enlace covalente fosfotirosina y cortando el enlace fosfodiéster del DNA al mismo tiempo. La reunión de la hebra de DNA se lleva a cabo por una segunda transesterificación, la cual es básicamente la reversa de la primera, el oxígeno del grupo hidroxilo del DNA que se generó de la primera reacción ataca el fósforo del enlace fosfotirosina, rompiendo el enlace covalente entre la proteína y el DNA, recuperando con esto la unión en el DNA (Figura 8) ⁽¹⁶³⁾.

Como resultado de su mecanismo catalítico, la topo II puede relajar moléculas de DNA superenrolladas (negativamente o positivamente) y también puede remover DNA anudado y enredado, que es común encontrarlo en el genoma. Estas funciones hacen que la topo II sea esencial para la sobrevivencia de la célula. En ausencia de las topo II, las células no pueden segregar las cromátidas hermanas y como resultado de esta falla mitótica la célula muere.

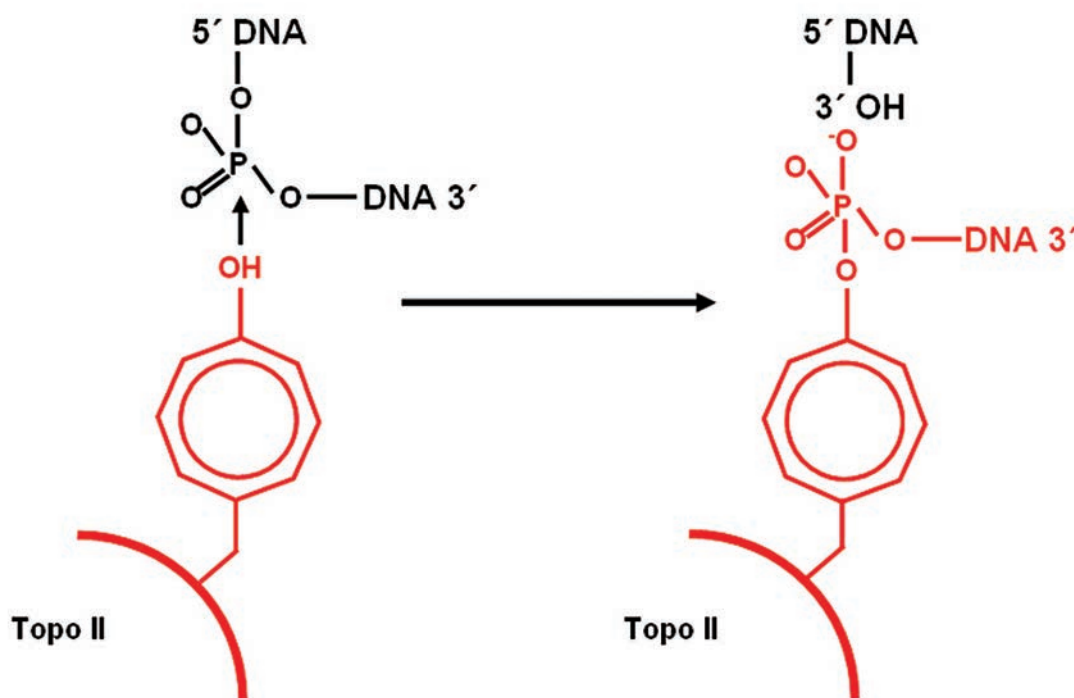


Figura 8. Rompimiento transitorio del DNA catalizado por la topo II alfa. La transesterificación entre la tirosina de la topo II alfa y el grupo fosfato del DNA permite el rompimiento de la hebra del DNA y la formación de un intermediario covalente entre la enzima y el DNA. La re-unión de la hebra del DNA se lleva a cabo por la reacción reversa. En la reacción, el 3'-OH es el grupo libre y la tirosina se une al grupo fosforil-5'.

IX. RESISTENCIA A FÁRMACOS MEDIADA POR TOPO II ALFA

IX.1 *Inhibidores de topo II alfa*

La topo II alfa es blanco de un gran número de fármacos terapéuticos incluyendo anti-parasitarios, antimicóticos, antivirales y antineoplásicos ⁽¹⁶³⁾. Particularmente, algunos fármacos trabajan uniendo directamente a la enzima, estabilizando el complejo topo II alfa-DNA e interfiriendo con la actividad enzimática para religar las cadenas de DNA. Esta característica es la razón por la cual estos fármacos son conocidos como inhibidores de topoisomerasas II. Además, en células tumorales, la cantidad total de topo II alfa puede ser un elemento crucial para la actividad citotóxica de los fármacos antineoplásicos ⁽¹⁶⁴⁾.

Aunque su estructura química es extremadamente diversa, el mecanismo de inhibición permite ubicar a estos fármacos en al menos dos grupos: el primero de ellos, comprende los fármacos capaces de estabilizar el complejo topo II alfa-DNA e interferir en la actividad de religación del DNA de la enzima. Entre estos fármacos se encuentran doxorubicina, etopósido, teniposido m-amsacrina, estos fármacos se conocen como venenos de topo II ⁽¹⁶⁵⁾. En un segundo grupo se encuentran aquellos fármacos que son incapaces de estabilizar el complejo enzima-DNA, pero que su citotoxicidad se presenta por interferir con alguna otra característica bioquímica en el ciclo catalítico. Por otro lado también se ha sugerido que estos fármacos actúan aumentando la capacidad de la enzima de formar los complejos de corte, entre estos fármacos están el merbaron, fármacos derivados de bis-(2,6-dioxopiperazina), ciertas antraciclinos y fostriecina. Estos fármacos se denominan inhibidores de topo II alfa ^(166,167).

IX.2 *Complejos de corte topo II-DNA*

Con el fin de mantener la integridad del material genético a través de la reacción del paso del DNA de doble cadena, la topo II forma enlaces covalentes entre el sitio activo de la enzima, que es el residuo de Tyr₈₀₄ (uno por cada subunidad del homodímero), y el extremo recién generado por el corte al DNA ⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾. Este complejo covalente topo II-DNA cortado, que se conoce como complejo de corte, es un sello característica de las topoisomerasas II. Más allá de él papel esencial del complejo de corte en el ciclo catalítico de la topo II, es la unión primaria entre la enzima y el cáncer. El complejo de corte topo II-DNA es el blanco citotóxico para el etopósido y otros fármacos anticancerígenos.

Normalmente, los complejos de corte son intermediarios efímeros en el ciclo catalítico de la topo II. Como consecuencia de esto, la concentración del complejo topo II-DNA cortado se encuentra en niveles muy bajos y son tolerados por las células ⁽¹⁷¹⁾. Sin embargo, un aumento en la concentración o en la vida media de estos complejos

de corte puede iniciar un gran número de eventos mutagénicos (Figura 8) ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁵⁾. Por ejemplo, cuando los complejos proteicos de la replicación se encuentran y chocan con los complejos de topo II-DNA cortado, este corte transitorio es convertido en permanente en el DNA de doble cadena en el genoma ⁽¹⁷⁶⁻¹⁸⁰⁾. Una vez que los extremos de DNA ya no están unidos por la topo II, estos se convierten en blanco para recombinarse o bien para ser reparados por los sistemas que tiene la células. Dependiendo el sistema empleado, la reparación de estos cortes permanente en el DNA pueden generar inserciones cromosomales, deleciones, translocaciones y otras aberraciones ^(172,174,181). Si estos cortes permanentes están presentes en un gran número, se inician las vías de muerte celular (Figura 9) ⁽¹⁷³⁾.

Los fármacos como el etopósido que incrementan la concentración de los complejos de corte se conocen como venenos de topo II porque convierten a esta enzima en una toxina celular potente ⁽¹⁸¹⁻¹⁸⁵⁾. Los venenos de topo II actúan por dos mecanismos que no se excluyen mutuamente (Figura 9A). Mientras algunos fármacos como el etopósido dañan la capacidad de la enzima para religar las moléculas de DNA cortadas, otros compuestos como las quinolonas tienen pocos efectos en la capacidad de religación y se piensa que lo que estimula es la capacidad de corte del DNA.

La actividad de los venenos de topo II contrasta con la de los inhibidores catalíticos de la topo II, los cuales actúan al bloquear la actividad catalítica de la enzima (Fig. 9B) ^(186,187). Los inhibidores catalíticos de topo II pueden actuar en varios de los diferentes pasos del ciclo catalítico de la enzima. El inhibidor mostrado en la figura 8B refleja la actividad de compuestos como el merbaron, el cual bloquea la reacción de corte al DNA ⁽¹⁸⁷⁾.

De acuerdo al mecanismo de acción de los venenos de topo II, el aumento de la concentración de las topo II, hace que estos fármacos sean más potentes. Los altos niveles de topo II que se presentan en las células cancerosas dan una parte de la ventana terapéutica para el etopósido y otros fármacos quimioterapéuticos que tienen como blanco esta enzima.

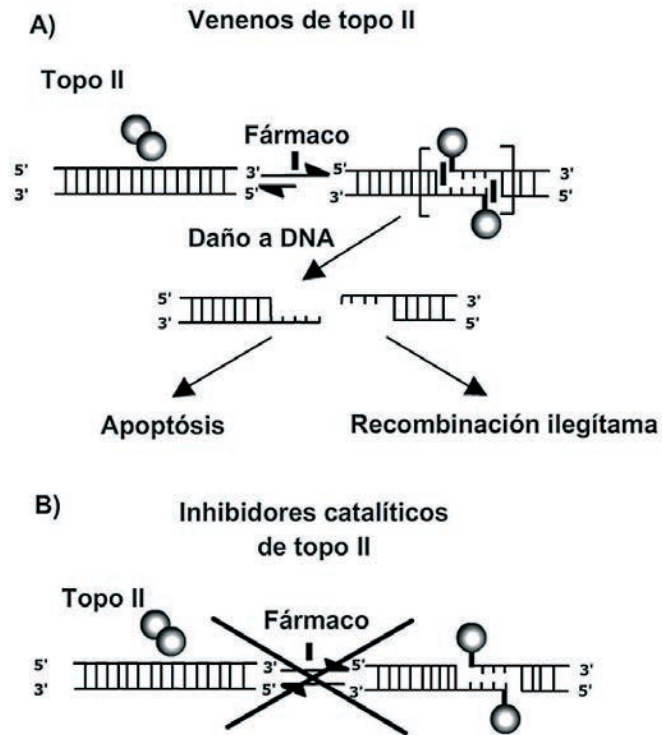


Figura 9. Diferencia entre los fármacos que interactúan con las topo II. Los venenos (A) y los inhibidores catalíticos de la función enzimática (B). Los venenos de topo II (A) inhiben la actividad de ligasa de la enzima y esto provoca cortes permanentes en el DNA, que pueden inducir el encendido de vías apoptóticas. En cambio los inhibidores de topo II (B) bloquea en algún punto del ciclo catalítico la actividad de la enzima, impidiendo la función de la topo II.

IX.3 Acciones del etopósido sobre la topo II

El etopósido mata las células al incrementar los niveles de los complejos de corte topo II-DNA ^(188,189). Este fármaco fue uno de los primeros fármacos que se identificaron que tenía como blanco directo a la topo II.

Se encuentra en debate la contribución relativa de la topo II alfa y beta a la actividad del etopósido en células de mamíferos. Este fármaco tiene efectos similares sobre el corte del DNA mediado por ambas isoformas *in vitro* ^(191,192) y parece tener como blanco a ambas enzimas en células humanas cultivadas ^(190,191). De manera que, es probable que la topo II alfa y beta tengan un papel en mediar la eficacia del etopósido, y que la contribución relativa de ambas isoformas depende del tumor y de las condiciones del paciente. Aunque se ha reportado que el etopósido tiene una mayor afinidad por la topo II alfa.

IX.4 Formación del complejo ternario topo II-DNA-etopósido

El complejo ternario topo II-DNA-etopósido se puede formar de tres diferentes formas: el etopósido puede entrar al complejo a través de la interacción con la enzima, con el DNA, o con el complejo binario topo II-DNA ⁽¹⁹³⁾. Inicialmente se creía que los fármacos entraban al complejo a través de interacciones con el DNA o bien con el complejo binario topo II-DNA. Sin embargo, las evidencias sugieren que el etopósido entra al complejo a través de la interacción con la topo II. Primero, contrario a la mayoría de los venenos de topo II, el etopósido tiene muy poca capacidad de unirse al DNA solo ⁽¹⁹⁴⁾. Segundo, el etopósido se une a la topo II de levadura y a la topo II alfa de humano en ausencia de DNA ^(195,196). Además, las concentraciones necesarias de etopósido para unirse se aproximan a los niveles necesarios para aumentar el número de los complejos de corte ^(195,196). Tercero, la afinidad del etopósido por una topo II mutada disminuye, en comparación con la topo II silvestre ⁽¹⁹⁵⁾. Finalmente, los niveles del complejo topo II-DNA cortado son altos cuando el etopósido es incubado con la enzima antes de adicionarse el DNA, en contraste con aquellos generados cuando el fármaco se incubaba primero con el DNA y después de agrega la topo II ⁽¹⁹⁷⁾.

Sin embargo, es probable que el etopósido interaccione con el DNA en el complejo ternario. Por ejemplo, el fármaco altera el sitio de corte en el DNA utilizado por la topo II e induce preferencialmente el corte en sitios que tienen una citosina en el extremo 5' ⁽¹⁹⁸⁾.

IX.5 Mecanismo de acción del etopósido

Los venenos de topo II aumentan los niveles de los complejos de corte. Algunos fármacos actúan por inhibir la capacidad de topo II de ligar el DNA cortado. Los fármacos de esta clase no solo aumentan la concentración de los complejos de corte, sino que también incrementan su vida media (Figura 10). Otros fármacos tienen poco efecto en la actividad de ligasa de la topo II y se presume que actúan incrementando la proporción de DNA cortado por la enzima. En base a ensayos que monitorean la capacidad de topo II de religar al DNA que ha sido cortado o de ligar dos fragmentos separados de DNA, el etopósido actúa inhibiendo la actividad de ligasa de la enzima ⁽¹⁹⁹⁾.

Desafortunadamente, no existe un estudio cristalográfico del dominio de corte y ligación del DNA de la topo II que incluya al DNA o a algún fármaco ⁽²⁰⁰⁾. Sin embargo, aún cuando no se conoce con precisión como el etopósido afecta la capacidad de la topo II de ligar los cortes del DNA. El fármaco puede interferir con las interacciones no covalentes entre la enzima y el DNA. De manera alternativa, también puede alterar la posición del extremo de DNA que va a ser ligado o insertarse entre el extremo y la enzima y actuar como un bloqueador físico para llevar a cabo la ligación ⁽²⁰¹⁾.

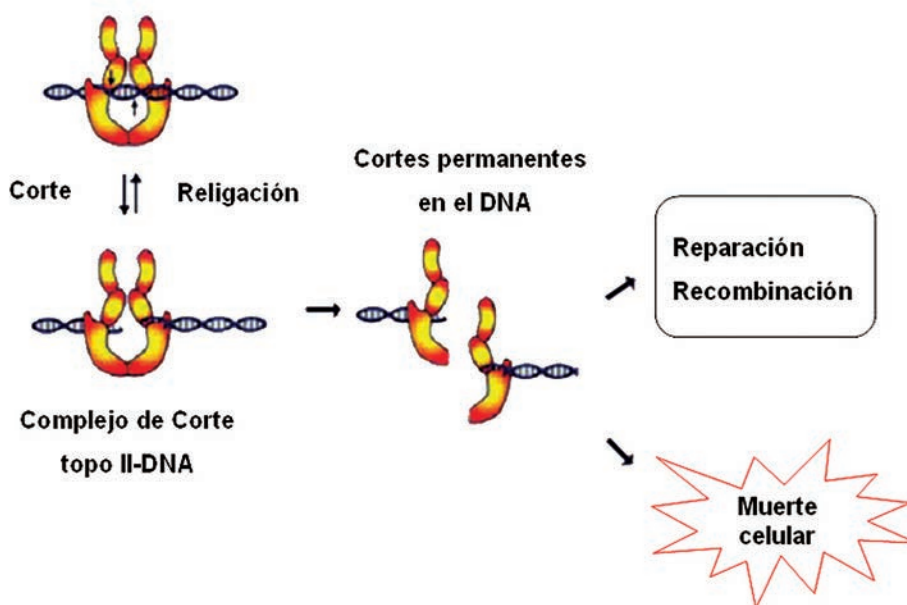


Figura 10. Efectos del complejo de corte topo II-DNA en la célula. En condiciones normales los complejos de corte topo II-DNA son intermediarios transitorios en el ciclo catalítico de la enzima y están presentes en concentraciones bajas. Sin embargo, cuando los niveles del complejo de corte aumentan, estos pueden convertirse en cortes permanentes en el DNA que pueden encender vías de reparación/recombinación del DNA o vías de muerte celular.

A pesar de no conocer el mecanismo preciso, las evidencias sugieren que el etopósido actúa muy cerca de los enlaces donde se lleva a cabo el corte ⁽¹⁹⁹⁾. Sin embargo, parece que la interacción del etopósido con uno de los enlaces de corte es independiente de su interacción con el otro, y que cada molécula del fármaco estabiliza solo un corte en las hebras de DNA ⁽¹⁹⁹⁾. Además, se requieren de dos moléculas para incrementar los niveles de cortes en el DNA de doble cadena. Esto explica el hecho de que el etopósido produce una gran cantidad de cortes en el DNA de cadena sencilla a concentraciones fisiológicas ⁽¹⁹⁹⁾. Por otro lado, esto implica que los efectos citotóxicos del etopósido pueden estar asociados de manera más cercana con la generación de cortes en cadenas sencillas de DNA más que en DNA de doble cadena. Estos cortes en DNA de cadena sencilla se convertirán en cortes permanentes de DNA de doble cadena por la acción de las horquillas de replicación ⁽²⁰²⁾.

IX.6 Alteraciones en la topo II alfa

Desde el descubrimiento de líneas celulares resistentes a fármacos que no expresaban glicoproteína-P (gp-P, el mecanismo clásico de resistencia a fármacos), las alteraciones en la topo II alfa se han sugerido como un mecanismo alternativo que confiere resistencia. Actualmente, existen varias evidencias que muestran que las alteraciones en la topo II alfa son responsables para la adquisición del fenotipo de resistencia a fármacos. Estas alteraciones han sido reportadas en varios estudios usando tanto líneas celulares tumorales como muestras de tumores, siendo posible en el último caso correlacionarlas con el grado de avance de la enfermedad ⁽²⁰³⁾.

Las alteraciones de la topo II alfa descritas que se asocian con la resistencia a fármacos son: a) disminución en la concentración de la enzima; b) mutaciones que alteran la unión con el DNA y por lo tanto su actividad catalítica y c) una localización citoplasmática de la enzima.

IX.6.1 Expresión disminuida de topo II alfa

Existe un gran número de líneas celulares seleccionadas a inhibidores y venenos de topo II alfa (etopósido, doxorubicina, mitoxantrona, m-AMSA y 2-metil-9-hidroxi-ellipticina), en donde la resistencia ha sido directamente asociada con una expresión de topo II alfa disminuida y consecuentemente una disminución en el número de complejos de corte topo II-DNA ⁽²⁰⁴⁻²¹¹⁾. En estas células, los niveles bajos de topo II alfa reducen la formación del complejo fármaco-enzima-DNA, así como el número de cortes en la hebra de DNA. En contraparte, cuando se han observado niveles de expresión altos de topo II alfa el resultado es un fenotipo de hipersensibilidad, es decir, se pueden formar una gran cantidad de complejos ternarios que darán como resultado la muerte de la célula ⁽²¹²⁾.

Adicionalmente, un patrón de resistencia a fármacos ha sido también encontrado en líneas celulares que están estacionadas en la fase Go y por lo tanto los niveles de la topo II alfa son muy bajos. En la línea celular HL-60/MX2, que es una leucemia humana, resistente a mitoxantrona, se presenta una reducción de 3 a 4 veces en los niveles de actividad catalítica de la enzima extraíble del núcleo y una ausencia total determinada por Western Blot, la explicación de este fenómeno se asocia con una disminución en la tasa de transcripción del gen de topo II alfa, que resulta en una baja concentración de la proteína en el núcleo y por lo tanto también una disminución de los complejos de corte, por lo que la célula es resistente a la actividad de los venenos de topo II ⁽²¹³⁾.

Se han realizado estudios en los que se ha evaluado la actividad catalítica de la topo II alfa en muestras de tumores ⁽²¹⁴⁻²¹⁶⁾, los resultados han mostrado que tanto la expresión de topo II alfa, así como su actividad catalítica son variables y dependen del tipo de tumor ⁽²¹⁷⁾.

IX.6.2 Mutaciones en topo II alfa

Un número de líneas celulares seleccionadas a venenos de topo II, han sido caracterizadas y se han encontrado mutaciones en el gen de topo II alfa comparadas con las líneas celulares parentales.

Varios estudios han identificado mutaciones en el gen de topo II alfa. En general, estos estudios mostraron que el conjunto de mutaciones descritas se agrupan en la región NH₂-terminal contigua al dominio de unión a ATP ⁽²²⁰⁻²²²⁾, cerca del residuo de tirosina donde se une al DNA ⁽²²³⁻²²⁶⁾ o bien, se han descrito mutaciones y deleciones en el extremo 3' del gen, que es donde se encuentran las SLN y SEN ^(230,231).

En varias de las mutaciones identificadas en la topo II alfa, se ha dificultado encontrar el papel de estas en la adquisición de la resistencia a fármacos ^(211,221,227,228). De esta manera, en leucemia linfocítica aguda, algunas alteraciones en la topo II alfa han sido asociadas con la resistencia a venenos de topo II, así como a un mal pronóstico de la enfermedad ^(220,222,229). También es claro que las mutaciones que están cercanas al residuo de Tyr₈₀₄, el residuo catalítico, afectan la unión a DNA y por lo tanto a la formación del complejo topo II-DNA-inhibidor ⁽²²³⁾.

Hasta el momento es difícil tener el espectro completo de mutaciones en la topo II alfa capaces de conferir resistencia a fármacos. Sin embargo, las mutaciones que afectan los sitios importantes en la actividad de la topo II alfa, como es el sitio de unión a ATP, sitio de unión a DNA o bien los sitios que regulan su actividad y su localización intracelular, han sido relacionadas directamente con la resistencia a venenos e inhibidores de topo II.

IX.6.3 *Topo II alfa citoplásmica*

Además de las alteraciones en la expresión del gen de topo II alfa y mutaciones que afectan la actividad de la enzima, asociadas con la resistencia a fármacos, existe un tercer mecanismo, este involucra un cambio en la localización intracelular de la enzima. Se ha descrito que en la región COOH-terminal se presentan mutaciones y deleciones, las cuales resultan en una localización de la topo II alfa en el citoplasma.

La pérdida o alteración de diferentes porciones de la región COOH de la topo II alfa han sido descritas en varias líneas celulares resistentes a fármacos en las que la topo II alfa es citoplásmica. En todos estos casos, la topo II alfa citoplásmica carece total o parcialmente la señal de localización nuclear SLN₁₄₅₄₋₁₄₉₇. Estos estudios de mutantes de la proteína con la región COOH truncada realizados en células humanas, indican que esta región de la enzima no es necesaria para su actividad catalítica, pero es necesaria para su localización nuclear ⁽²³⁰⁻²³⁶⁾. Las líneas celulares de cáncer de pulmón H209/V6 y H209/VP, seleccionada a etopósido, presentan una topo II alfa citoplásmica de 160 kDa con la región COOH truncada y no sintetizan topo II alfa normal, es decir de 170 kDa ⁽²³⁰⁾.

Algunas de estas líneas celulares, que expresaron a la topo II alfa en citoplasma, fueron seleccionadas a etopósido, sin embargo estas mutaciones varían en su extensión. Por ejemplo, en la línea celular de cáncer de pulmón, H69/VP seleccionada a etopósido, una mutación puntual al final del intrón 34 resultan en el uso de un aceptor 3' críptico en el sitio de splicing en el exón 35. Y como consecuencia, se pierden 3 aminoácidos del segundo dominio básico de la señal de localización nuclear NLS 1454-1497. Esto resulta en una proteína citoplásmica con un peso molecular que no difiere sustancialmente del de la enzima normal ⁽²³¹⁾. En contraste, los alelos mutantes de topo II alfa en las líneas celulares H209/V6, que es de pulmón ^(232,233) y HL60/MX2, una leucemia ^(228,234), seleccionadas al etopósido y mitoxantrona respectivamente, también presentan deleciones relativamente grandes (> 1.5 kb) que comienzan en el intrón 33. Como en las células H209/VP, H209/V6 y HL60/MX las proteínas mutantes de 160 kDa no contienen los últimos 109 aminoácidos del COOH, presentes en la enzima normal. De manera que las proteínas mutantes de 160 kDa y las topo II alfa de 170 kDa en estas diferentes líneas celulares son codificadas por RNAm de diferentes tamaños. De esta forma, los RNAm de topo II alfa son de 4.8 kb y 6.2 kb en las células H209/V6, 4.8 kb en las células HL60/MX2 y de 6.1 kb en las células H209/VP ^(228,235,236).

También se han descrito otras líneas celulares, que también fueron seleccionadas a etopósido, T47D/VP y MCF7/VP, de mama, y CEM, una leucemia, en las que la topo II alfa tiene un peso molecular de entre 140-160 kDa ⁽²³⁷⁻²³⁹⁾. En estas líneas celulares se encuentran deleciones en la región 3' del gen de aproximadamente 200 nt que

dan como resultado un RNAm de menor tamaño al normal, y al analizar la localización intracelular de la topo II alfa en estas líneas celulares, dadas las alteraciones en la región 3' del gen se tradujo en una proteína truncada de la región COOH con localización exclusiva en el citoplasma.

Todas estas líneas celulares, de diferentes tipos de cáncer, fueron seleccionadas a venenos de topo II, todas ellas presentaron a la topo II alfa en el citoplasma, como consecuencia de mutaciones o deleciones en el extremo 3' del gen que alteran a las SLN, en comparación con sus líneas parentales, en donde la topo II alfa es nuclear. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito líneas celulares que presenten a la topo II alfa citoplásmica, que no hayan sido seleccionadas a algún veneno de topo II.

III. RESUMEN

La topo II alfa es blanco de varios agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica. En las células tumorales resistentes a venenos de topo II se han descrito alteraciones en la expresión o en la estructura de la enzima que derivan en una disminución de la actividad. Recientemente, se ha descrito la localización citoplásmica de la topo II alfa como un mecanismo que confiere resistencia a fármacos. En este estudio reportamos la caracterización de una línea celular de cáncer de pulmón de la variedad de células no pequeñas (NSCLC), denominada INER-37. Esta línea celular exhibió una gran resistencia al etopósido ($92.9 \mu\text{M}$) en comparación con otras líneas celulares de cáncer de pulmón. Al analizar por RT-PCR la expresión de genes relacionados con la resistencia a fármacos, se encontró la expresión de topo II alfa, MRP1 y GST-M1, pero no del gen *mdr-1*. Sin embargo, al estudiar la actividad de desenrollamiento de topo II nuclear sobre el DNA de Φ -174, se observó una reducción en la actividad de topo II de las células INER-37 en comparación con la de las células HeLa. Por otro lado al examinar los extractos totales de proteína se encontró que la actividad de topo II en las células INER-37 era equivalente a la de células HeLa. Al analizar la localización intracelular de la topo II alfa por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo específico, se observó una distribución citoplásmica de la proteína. El análisis de las últimas 2 kilobases (kb) del RNAm de topo II alfa mostró una alteración en la región 3' del gen. Por northern blot se encontraron dos especies de RNAm, de 4.8 y 2.0 kb, en vez del normal de 6.1 kb. Utilizando el ensayo de 3'-RACE se delimitó la delección en el RNAm de 4.8 kb, que se encontraba a partir de la base 4162, misma que abarcaba parte de la región traducida y la región no traducida (3'-UTR). Al investigar a la proteína solo se encontró una de 160 kDa en las células INER-37. La proteína truncada mostró afectación en los últimos 96 aminoácidos de la región COOH-terminal, lugar donde se encuentran las dos señales de localización nuclear, estando alterada la señal más proxima al extremo carboxilo, esta señal se ubica entre los residuos de aminoácidos 1454-1497. La línea celular INER-37 es la primer línea celular descrita que presenta una mutación innata que afecta la región 3' del gen de topo II alfa, misma que confiere una localización citoplásmica de la enzima y que se asocia con la resistencia incrementada a etopósido. Por otro lado, al presentarse esta mutación de manera espontánea en esta línea celular que fue obtenida de un paciente con cáncer pulmonar, permite el estudio de esta mutación en células tumorales de pacientes con cáncer pulmonar y definir de una manera más precisa el tratamiento que se vaya a administrar a los pacientes.

IV. ABSTRACT

Topoisomerase II alpha is a target for many chemotherapeutic agents in clinical use. In tumour cells resistant to topoisomerase II-poisons, it has been described quantitative and qualitative alterations involved in this enzyme. More recently, the cytoplasmic localization of topoisomerase II alpha has been described as a mechanism to confer drug resistance. Here we report the characterization of a NSCLC cell line, INER-37, who shown a high level of resistance to the etoposide ($92.9 \mu\text{M}$) in contrast to other lung cancer cell lines. By RT-PCR analysis, INER-37 cells showed expression of topo II alpha, mrp-1 and gst-m1 but not mdr-1 gene. However, when nuclear extracts preparations of INER-37 cells were assayed for their capacity to unknotting $\Phi 174$ as substrate, it was evident a reduction in the topo II activity relative to nuclear extracts of HeLa cells. Interestingly, catalytic activity of topo II was founded in total INER-37 extracts. A cytoplasmic localization of topo II alpha was evident by immunocytochemistry using specific antibodies against topo II alpha. The analysis of the last 2 kb of the mRNA of topo II alpha showed alteration in the 3'-end region. By northern blot, two species of mRNA were identified (4.8 and 2.0 kb), instead of the wild type 6.1 kb. A 3'-RACE assay allowed to delimitate the deletion of 4.8 kb mRNA, downstream of 4162 nt, involving part of the coding region and the untranslated region (3'-UTR). Only one truncated protein of 160 kDa is expressed by INER-37 cells. The truncation affects the 96 amino acids of the COOH-terminal region where the more proximal bipartite NLS is located. INER-37 cell line is the first cancer cell line reported where an innate mutation affecting the 3'-end region of topo II alpha gene confer a cytoplasmic localization of the enzyme and therefore increase resistance to etoposide.

X. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es un problema de salud pública que presenta una alta tasa de mortalidad, ocupando el primer lugar entre los tumores sólidos en México. El principal tratamiento que se da a los pacientes es la administración de fármacos antineoplásicos, sin embargo uno de los principales problemas que se presenta cuando se da este tipo de tratamiento es la resistencia múltiple a fármacos. La resistencia múltiple a fármacos es un fenómeno que implica que los tumores desarrollen resistencia a un amplio espectro de fármacos que no tienen relación estructural entre ellos y a los que no han sido expuestos. La resistencia puede ser innata o adquirida. La resistencia innata es aquella que presenta un tumor sin contacto previo a los fármacos, mientras que la adquirida es la que aparece tras el contacto con uno o varios de ellos. Varios mecanismos se relacionan con la resistencia a fármacos, entre ellos se encuentran la sobreexpresión de genes como: *mdr-1*, *mrp 1-6*, *lrp*, *gst* y *bcrp*. Estos genes y sus productos convierten en refractaria a la célula, dando como resultado una disminución en la concentración del fármaco dentro de la célula, evitando así la muerte de la célula. Otro mecanismo implica alteraciones en la enzima topo II alfa. Varios estudios han reportado alteraciones en la topo II alfa, como son: disminución en la expresión del gen; mutaciones en el gen que afectan su actividad catalítica, así como la localización citoplásmica de la enzima. Todas estas alteraciones han sido descritas en líneas celulares que han sido seleccionadas o bien en muestras de pacientes tratados con algún inhibidor de topo II, es decir en células con una resistencia adquirida. El estudio y caracterización de líneas celulares de cáncer de pulmón que presentan una resistencia innata a inhibidores de topo II permitirá avanzar en el conocimiento básico de los mecanismos de resistencia a fármacos que presentan las células tumorales de cáncer de pulmón. Este conocimiento puede conducir al establecimiento de estrategias terapéuticas a futuro, que ayuden al paciente.

XI. ANTECEDENTES PARTICULARES

La línea celular INER-37 corresponde a una línea celular tumoral obtenida a partir de una muestra de derrame pleural, de un paciente con cáncer primario de pulmón no tratado con quimioterapia. Análisis histológicos identificaron a estas células como un adenocarcinoma. En condiciones *in vitro*, las células INER-37 crecieron en forma de monocapa con un tiempo de división de 30 horas.

En ensayos de citotoxicidad utilizando varios fármacos, se encontró que las células INER-37 presentaron una resistencia mayor a etopósido y tenipósido (venenos de topo II), en comparación a otras cuatro líneas celulares humanas de cáncer de pulmón. El índice de citotoxicidad (IC_{50}) para el etopósido fue de $92.9 \mu M$ en las células INER-37 y fue 34 veces más resistente en comparación a la línea celular INER-51 ($2.7 \mu M$), 25 veces más resistente comparada con las células A-427 ($3.7 \mu M$) y 24 veces más resistente que las células PSC-1 ($3.8 \mu M$). Al comparar las células INER-37 con las células VP-1, línea celular seleccionada a etopósido, la resistencia fue muy parecida, 1.3 veces ($70.9 \mu M$). La resistencia a tenipósido también fue alta en las células INER-37 ($11.7 \mu M$) en comparación con las otras 4 líneas celulares. Sin embargo el IC_{50} de doxorubicina en la línea celular INER-37 fue de $2.1 \mu M$, menor que la presentada por las líneas celulares INER-51, VP-1 y PSC-1 (4.4 , 71 y $9.2 \mu M$ respectivamente), estas líneas celulares expresan el gen *mdr-1*, excepto PSC-1, seleccionada a doxorubicina.

Tabla I. Perfil de resistencia de la línea celular INER-37, así como de otras líneas celulares de cáncer de pulmón a fármacos quimioterapéuticos.

Fármaco	Líneas celulares	De cáncer	de pulmón		
	INER-37 $IC_{50}(\mu M)$	INER-51 $IC_{50}(\mu M)$	PSC-1 $IC_{50}(\mu M)$	VP-1 $IC_{50}(\mu M)$	A-427 $IC_{50}(\mu M)$
Etopósido	92.9	2.7	3.8	71	3.7
Tenipósido	11.7	0.8	ND	2.4	ND
Doxorubicina	2.1	4.4	9.2	71	1.6
Camptoesina	9.6	0.16	ND	0.1	ND

Se utilizó el ensayo de MTT para evaluar el IC_{50} a varios fármacos. La exposición a los fármacos fue de 72 horas. IC_{50} : disminución del 50% en la población celular. ND: No Determinado.

XII. HIPÓTESIS

La línea celular de cáncer de pulmón, INER-37, presenta resistencia a etopósido y tenipósido; dada la especificidad de estos fármacos por la topo II alfa, esta resistencia podría ser resultado de alteraciones en los niveles de expresión, en la actividad catalítica o en la localización subcelular de la topo II alfa.

XIII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las alteraciones en la topo II alfa que se asocien con la resistencia a etopósido y tenipósido en la línea celular de cáncer de pulmón INER-37.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la expresión de los genes *mdr-1*, *mrp-1* y *gst-m1* relacionados con la resistencia a fármacos, en las células INER-37.
- Identificar posibles mutaciones en el gen de topo II alfa en las células INER-37.
- Evaluar la actividad catalítica de la topo II alfa en las células INER-37.
- Determinar la localización subcelular de la topo II alfa en las células INER-37.

XIV. MATERIAL Y MÉTODOS

XIV.1 *Reactivos*

Las epipodofilotoxinas, etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26) fueron adquiridas de Bristol-Meyers, mientras que la doxorubicina fue adquirida de Laboratorios Columbia. La camptotecina (CPT), ATP, tritón X-100 y PMSF fueron adquiridos de Sigma Chemical Co.(St. Louis MO). Los fármacos fueron disueltos en dimetil-sulfóxido (DMSO) en una solución 1 mM y diluidos a diferentes concentraciones en medio de cultivo.

XIV.2 *Cultivo celular*

Las líneas humanas de cáncer de pulmón utilizadas en este trabajo, fueron las células INER-37 (descrita anteriormente), INER-51 y sus clonas VP-1 y PSC-1. Las células VP-1 son una clona seleccionada a etopósido, mientras que las células PSC-1 fueron seleccionadas con doxorubicina y SDZ PSC 833 hasta obtener una clona que no expresara gp-P. Las líneas celulares A-427 y HeLa fueron obtenidas de la ATCC. Todas las líneas celulares de cáncer de pulmón fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 100 u/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina. Las células HeLa fueron crecidas en medio de cultivo D-MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO₂ y en atmósfera húmeda.

XIV.3 *Ensayo de citotoxicidad y determinación del IC₅₀*

El índice de citotoxicidad (IC₅₀) se determinó utilizando el ensayo de MTT. Se sembraron 7×10^3 células en cada pozo de una placa de 96 pozos y los fármacos fueron adicionados a diferentes concentraciones en cada pozo. Después de 72 horas el medio de cultivo fue retirado y se agregó el MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) en PBS a una concentración final de 2 mg/ml. Después de 4 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS y los cristales fueron disueltos por la adición de DMSO al 100% y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector automatizado de placas (Labsystem Multiskan MS). Con base en las lecturas de absorbancia, se determinó el IC₅₀. La sobrevivencia de las células con fármaco fue estimada como porcentaje con respecto a su control correspondiente de células sin fármaco. El IC₅₀ corresponde a una disminución del 50% en la población celular.

XIV.4 Preparación de extractos nucleares

Los extractos nucleares, para los ensayos de actividad de topo II, fueron preparados a partir de células en crecimiento exponencial. Se tomaron de 2 a 5 X 10⁶ células en fase logarítmica y se lavaron por centrifugación en PBS. Al botón se le agregó 1 ml de amortiguador A [NaCl 50 mM, KH₂PO₄ 1 mM (pH 6.8), MgCl₂ 5 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.2 mM, PMSF 1 mM]. Una vez resuspendido el botón, se le agregó 9 ml de amortiguador A con 0.3% de Tritón X-100, y la muestra se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 minutos. El botón celular se lavó por centrifugación con 10 ml de amortiguador A. Enseguida el botón se resuspendió en 0.5 ml. de amortiguador A y 0.5 ml. de amortiguador B [Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, DTT 0.1 mM, PMSF 1 mM] y se dejó incubar durante 1.5 horas a 4°C. Después de la incubación la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el botón se resuspendió en 50 µl de amortiguador A y 50 µl de amortiguador B, esta solución se diluyó en 100 µl de glicerol al 87%, y la muestra fue almacenada a -20°C. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry-Follin.

XIV.5 Preparación de los extractos celulares para actividad enzimática

Se tomaron de 2 a 5 X 10⁶ células en fase logarítmica y se lavaron por centrifugación. El botón celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador C [NaCl 100 mM, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), PMSF 0.1 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 0.1 % y una mezcla de inhibidores de proteasas que contiene AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina, peptatina A y E-64 (Sigma Co)], y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Al lisado celular se le agregó 1 ml de amortiguador B (extracto nuclear) y se homogeneizó la muestra. Se dejó incubar durante 2 horas a 4 °C. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos. Finalmente el botón celular se resuspendió en 50 µl de amortiguador C y 50 µl de amortiguador B, y esta solución se diluyó en 100 µl de glicerol al 87%. La muestra se almacenó a -20 °C. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry-Follin.

XIV.6 Ensayo de actividad de topo II sobre DNA ϕ -174

La actividad enzimática de topo II se midió a través del ensayo de desenrollamiento de DNA del fago ϕ -174 ⁽¹⁰⁴⁾. El ensayo se realizó con extractos nucleares y extractos totales. Se utilizaron diferentes concentraciones de proteína y se incubaron con 0.5 µg de DNA del ϕ -174 en amortiguador de Tris 5x [Tris 50 mM (pH 7.5), KCl 85 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 0.5 mM, 30 µg/ml de BSA, ATP 1 mM] en un volumen final de 25 µl, a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo, colocando las muestras a 4°C, por la adición de 2.5 µl de proteinasa K (1µg/µl) y 2.5 µl de SDS al 10%. Para visualizar los resultados se realizaron geles de agarosa al 1%, los fragmentos de DNA fueron teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados con una cámara Polaroid.

XIV.7 Inmunocitoquímica

Las líneas celulares INER-37 y HeLa fueron crecidas sobre portaobjetos y fueron analizadas por inmunodetección de la topo II alfa con tinción indirecta de inmunoperoxidasas utilizando un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-topo II alfa (obsequio del Dr. Leroy F. Liu) a una dilución de 1:100. La detección del anticuerpo primario se hizo con el sistema de detección (Genzyme) con el uso de un anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con biotina. Después se incubó con estreptoavidina conjugada con HRP (Horseradish Peroxidase), utilizando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB). Las laminillas fueron fotografiadas con una cámara digita en un microscopio Nikkon.

XIV.8 Western blot

De 2 a 5 X 10⁶ de células fueron resuspendidas en 500 µl de amortiguador C y lisadas por repetidas congelaciones en N₂ líquido. Las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 7.5%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada durante 1 hora en PBS con 3% de leche descremada, 0.02% de azida de sodio, 0.02% de Tween 20 y fue incubada con los anticuerpos primarios anti-topo II alfa dirigidos a la región central de la proteína (S-20, Santa Cruz Biotech., USA, Cal.) y a un epitopo cercano a la región COOH- terminal (K-19, Santa Cruz Biotech., USA, Cal.). Para estos estudios la dilución de los anticuerpos fue de 1:100 en PBS con 0.02% de Tween-20 y 0.02% de azida de sodio. También se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce los 16 últimos aminoácidos de la región COOH- terminal de topo II alfa (TopoGen, Columbus Ohio). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario a 4°C, durante toda la noche. Después se lavó con PBS y Tris-Salino; se incubó durante 1 hora a 37 °C con un segundo anticuerpo anti-cabra, ratón y conejo conjugado con HRP-multilink (DAKO, Inc.). El revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection system, Amersham, Biosciences. UK). Se utilizó como control un anticuerpo monoclonal anti-actina (IgM, ZYMED, Inc.).

XIV.9 Análisis por RT-PCR

El RNA total fue extraído utilizando Trizol (Invitrogen™, Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 µg de RNA total para sintetizar cDNA, utilizando la transcriptasa reversa SuperScript (Invitrogen™, Life Technologies) y oligo dT₁₆₋₁₈. La reacción de amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, que contenía 5 µl de cDNA, 50 pM en concentración de cada oligonucleótido utilizado, 30 µM de cada deoxinucleotido trifosfato (dNTP), 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa, 50 mM KCl, 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador y se hicieron 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 55-60 °C durante 2 min y polimerización a 72°C durante 3 min. La secuencia de los oligos utilizados es: topo II alfa (ATP), sentido 5'-ctgaaggaagccctcaagaag-3', antisentido 5'-ggctctaggtggactagcatc-3' (300 pb); GAPDH, sentido 5'- tggggaaggtgaaggtcgga -3', antisentido 5'- gaaggggtcattgatggcaa - 3' (110 pb); MRP-1, sentido 5'-tctctcccgacatgaccgagg-3', antisentido 5'- ccaggaatatgatgccccgacttc-3' (140 pb); GST-µ, sentido 5'- gaactccctgaaaagctaaag-3', antisentido 5'-gtt-gggctcaaatacgggtgg-3' (250 pb); mdx-1, sentido 5'-cccatcattgcaatagcagg-3', antisentido 5'- gttcaaacttctgctcctga-3' (140 pb). Los oligos utilizados para analizar la región 3' del gen de topo II alfa se localizaron de acuerdo a la posición de la secuencia de cDNA descrita por Campain et al ⁽⁸³⁾: FI (3021-3570 nt), FII (3519-4162 nt), y FIII (4124-4771 nt)(Fig. 8). Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida, teñidos con bromuro de etidio.

XIV.10 Northern blot

Diez microgramos de RNA se separaron en un gel de agarosa al 1% que contenía 0.66 M de formaldehído y se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond N+ (Amersham, International, Buckinghamshire, United Kingdom). La sonda que se utilizó para detectar el mRNA de topo II alfa fue un fragmento de 293 nt cDNA, obtenida por RT-PCR de células HeLa de la región 3' del gen (1246 al 1539 nt). Esta se marcó con [³²P-α-CTP] por Random Primer utilizando al fragmento Klenow (Invitrogen™, Life Technologies). Se hibridó durante 18 horas a 42°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas con solución 1 (2X SSC, 0.1% SDS) a temperatura ambiente, y un lavado con solución 2 (0.1X SSC, 0.1 % SDS) a 55 °C. El RNA 18S, teñido con bromuro de etidio, se utilizó como control de cargado. Las membranas fueron expuestas a placas autoradiográficas Kodak X-OMAT AR a -70 °C.

XIV.11 Análisis de la región 3' del gen de topo II alfa por 3'RACE

La técnica de 3'RACE fue usada para amplificar el extremo de la región 3' del gen de topo II alfa, utilizando el kit 3'RACE (InvitrogenTM, Life Technologies). El cDNA fue generado utilizando un oligo RT: 5'-aaggatccgtcgacatcgataatacgactcactataaggattttttttttttttt-3'. El PCR se llevó a cabo utilizando el oligo sentido específico de topo II alfa 5'-ctgaaggaagccctcaagaag-3' en la posición 3857 en el cDNA y el oligonucleótido antisentido 5'-gacatcgataatacgac-3', que corresponde a la región subrayada en el oligonucleótido RT. Cada reacción contenía 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM dNTPs, 0.1 unidades de Taq DNA polimerasa y 200 nM de cada oligo utilizado en un volumen final de 25 µl. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min y 72 °C durante 4 min, en el primer ciclo, y los siguientes 35 ciclos: 94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min y 72 °C durante 3 min. Los productos fueron separados en geles de poliacrilamida, teñidos con bromuro de etidio.

XV. RESULTADOS

XV.1 *Análisis por RT-PCR de la expresión de genes relacionados con la MDR*

Las líneas celulares seleccionadas con epipodofilotoxinas, etopósido y tenipósido, presentan un fenotipo de resistencia a fármacos, con resistencia cruzada a una gran variedad de compuestos. Un hallazgo en común en estas células es la disminución en la acumulación intracelular del fármaco o bien una distribución intracelular alterada, aparentemente debido a la sobreexpresión de genes como *mdr-1* o *mrp-1*. Varias de estas líneas celulares tumorales que presentan un fenotipo de resistencia a etopósido han mostrado alteraciones en la enzima nuclear topo II alfa; dentro de estas alteraciones se ha descrito la disminución en la concentración de la proteína ocasionada por una disminución en la expresión del gen, así como cambios en su actividad enzimática. Tomando en cuenta esto se decidió analizar primero la expresión por RT-PCR del gen de topo II alfa y de otros genes relacionados con la resistencia múltiple a fármacos.

Al analizar la expresión del gen de topo II alfa utilizando oligonucleótidos dirigidos a la región que codifica para la unión de ATP, en el extremo 5' del gen, los resultados mostraron una banda de amplificación de 343 pb al igual que en las células HeLa que fueron usadas como control de expresión (Figura 9 A), lo que sugirió que no había alguna alteración en la expresión de topo II alfa en células INER-37.

Además, se analizó la expresión de los genes *mrp-1* y *gst-m1* y esta fue positiva para ambos genes, sin embargo no se observó expresión del gen *mdr-1* (Figura 9 B). Las células INER-37 no expresaron el gen *mdr-1*, por lo que la actividad del producto de este gen, la gp-P, fue descartada como posible responsable de la resistencia a etopósido y tenipósido. Sin embargo, se detectaron los mensajeros de los genes *mrp-1* y *gst-m1*. El producto de estos dos genes se ha reportado que confieren resistencia a fármacos, pero no a etopósido y tenipósido; no obstante no se puede descartar la participación de este mecanismo (MRP-1/GST-M1) en la resistencia a etopósido y tenipósido en las células INER-37.

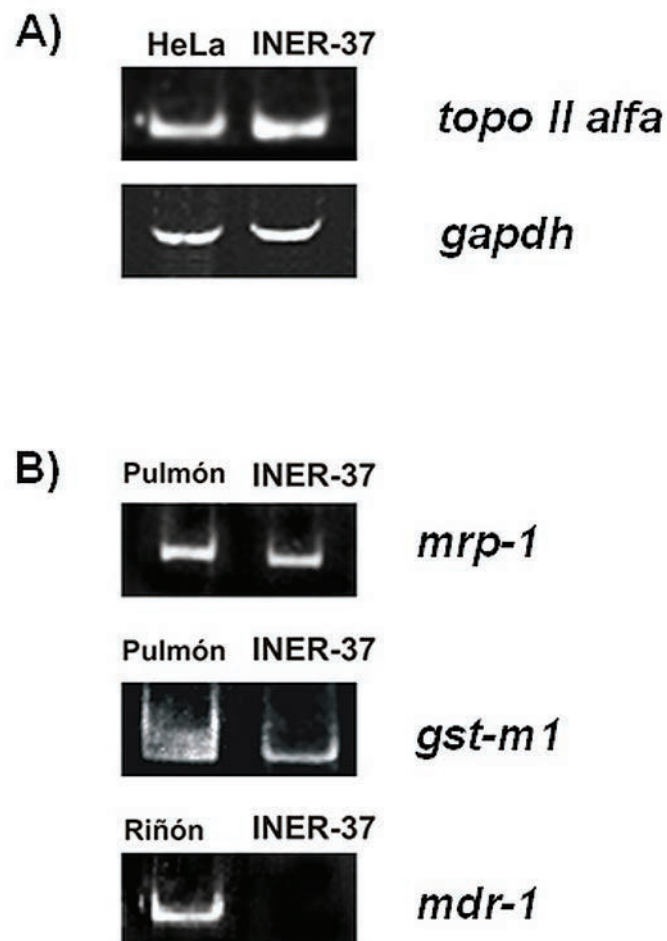


Figura 11. Análisis por RT-PCR de la expresión de genes relacionados con resistencia a fármacos en células INER-37. Cinco microgramos de RNA total se utilizaron para sintetizar cDNA y enseguida se realizó la PCR para amplificar los fragmentos. A) expresión de topo II alfa (células HeLa usadas como control). B) Expresión de los genes *mrp-1*, *gst-m1* y *mdr-1*. Tejido de pulmón y riñón fueron utilizados como controles positivos de expresión para estos genes.

XV.2 Actividad catalítica de topo II

Otra de las alteraciones descritas en las líneas celulares resistentes a etopósido, se refiere a la actividad catalítica de la enzima. Se analizó la actividad de topo II en extractos nucleares de las células INER-37, utilizando el ensayo de desenrollamiento del DNA del fago Φ -174 (Figura 10). Los resultados mostraron una actividad proporcional a las concentraciones de 1 a 6 μ g de proteína nuclear de las células HeLa, mientras que la actividad estaba reducida en las células INER-37. A los 3 μ g de proteína de extracto nuclear de células HeLa, la actividad de desenrollamiento fue del 50%, y en la misma concentración de proteína nuclear la actividad en células INER-37 fue nula (Figura 10 a y c), y el 80% del sustrato se mantuvo sin alteraciones, aún en la máxima concentración de proteína nuclear de 6 μ g. Estos resultados mostraron menor actividad de topo II en los extractos nucleares, esto podría ser resultado de la reducción en la concentración de la topo II dentro del núcleo o una alteración que afectara su actividad catalítica.

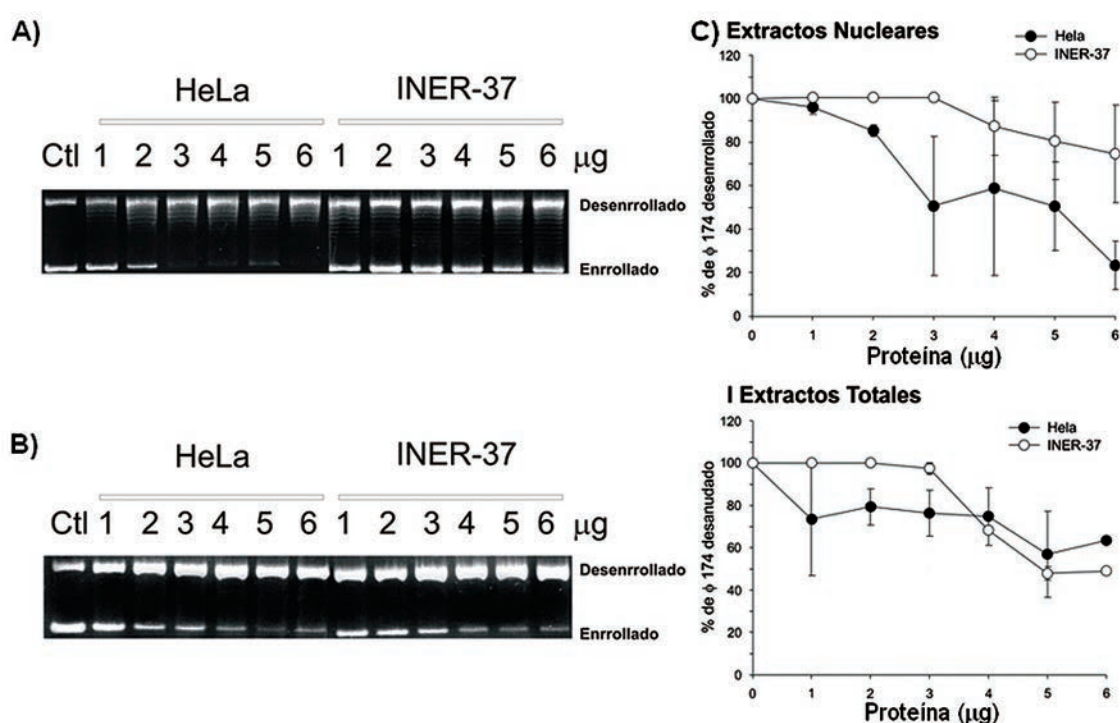


Figura 12. Ensayo de actividad catalítica de topo II por desenrollamiento de DNA de Φ -174. Extractos nucleares (a) y totales (b) de células INER-37 y HeLa se incubaron con 0.5 mg de DNA de Φ -174 durante 50 min. Las muestras fueron tratadas con proteínasa K y SDS para detener la reacción, y enseguida se separaron las formas del DNA en un gel de agarosa al 1%. c) y d) son gráficos de los análisis de densitometría de tres experimentos independientes ($\pm$ ES) que muestran la desaparición de la forma enrollada del DNA de Φ -174. Control (Ctl: DNA Φ -174 enrollado).

Para obtener mayor información se analizó la actividad de topo II en extractos totales de las células INER-37. Estos ensayos mostraron que en las células INER-37 la actividad de topo II es similar a la presente en las células HeLa, indicando con esto que la actividad catalítica de topo II estaba intacta, lo que sugiere una localización subcelular alterada de topo II (Figura 12 B y C).

XV.3 Localización subcelular de topo II alfa

En las líneas celulares que se han descrito con una localización subcelular alterada de topoisomerasas II, tienen como característica común, la presencia de la topo II alfa en el citoplasma. Para demostrar una localización citoplásmica de topo II alfa en la línea celular INER-37 se analizó por medio de una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a la topo II alfa. En la figura 13 se muestra una fotografía de una inmunocitoquímica representativa en las células INER-37, donde se encontró que la topo II alfa se localizó predominantemente en el citoplasma, en contraste con las células HeLa, en donde se encontró en el núcleo. Como se ha descrito en otras líneas celulares resistentes a etopósido, la resistencia a etopósido en las células INER-37 se puede asociar con la localización citoplásmica de la topo II alfa.

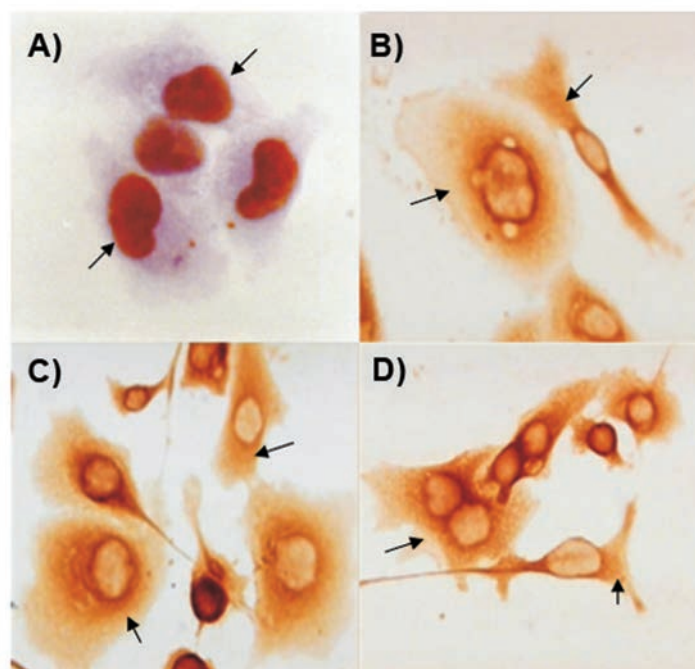


Figura 13. Inmunocitoquímica contra la topo II alfa en células INER-37 y HeLa. Las células fueron sembradas durante 4 horas en portaobjetos y después de realizó la detección de la enzima con un anticuerpo policlonal anti-topo II alfa hecho en conejo y revelado con el método de peroxidasa con diaminobenzidina. Las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio Nikon a x400 de aumento. A) HeLa y B-D) INER-37.

XV.4 Análisis del extremo 3' del RNAm de topo II alfa

Se han reportado deleciones en el extremo 3' del gen de topo II alfa, en líneas celulares resistentes a venenos de topo II que presentan a la topo II alfa en el citoplasma. Estos defectos daban como resultado un RNAm de menor tamaño y como consecuencia una proteína de menor peso. Para definir la mutación en el gen de topo II alfa en las células INER-37 que de como resultado la topo II alfa citoplásmica, se analizó el extremo 3' del gen por RT-PCR, utilizando 3 pares de oligonucleótidos que delimitan fragmentos de las últimas 2 kb. Las bandas de amplificación de los fragmentos I y II no mostraron ninguna diferencia en el tamaño esperado entre las células HeLa e INER-37, sin embargo el producto del fragmento III no fue amplificado en las células INER-37 en contraste con las células HeLa (Figura 14). Este resultado sugirió una deleción en el extremo 3' del gen de topo II alfa en las células INER-37.

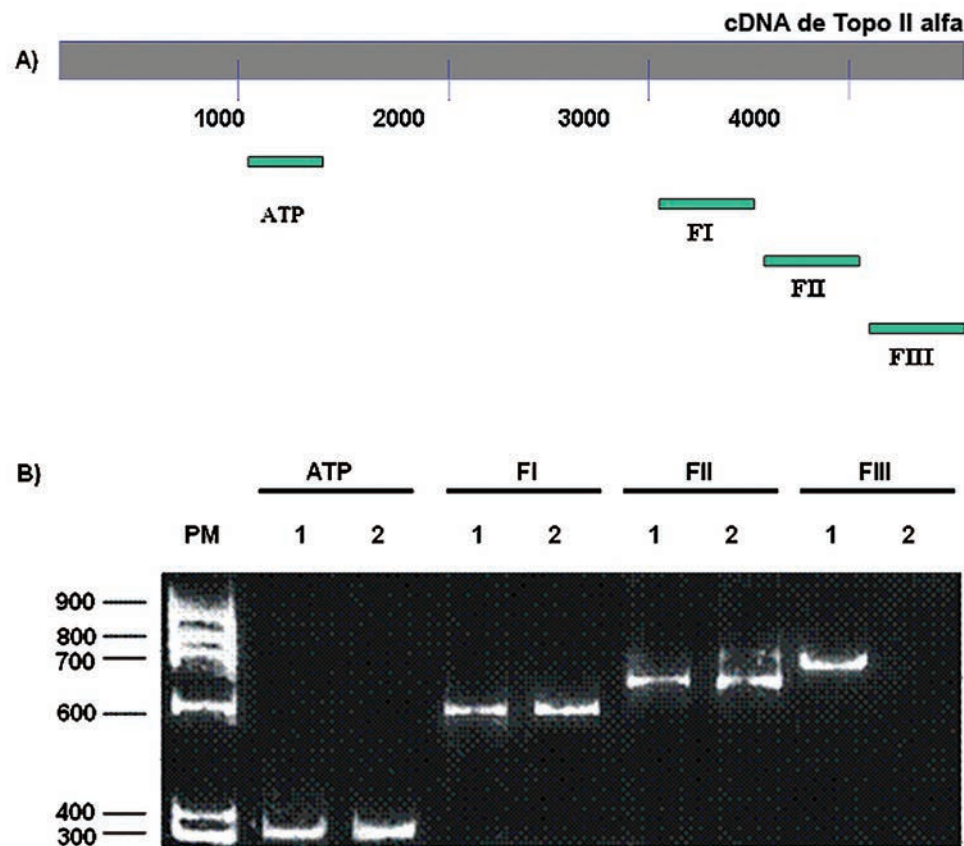


Figura 14. Análisis por RT-PCR de las últimas 2 kb del RNAm de topo II alfa en el extremo 3'. A) Se utilizaron los pares de oligonucleótidos denominados FI (549 nt), FII (643nt), FIII (647nt) y el fragmento ATP (300nt), como control. B) Electroforesis de los fragmentos obtenidos por RT-PCR. 1. HeLa; 2. INER-37.

Con el fin de delimitar la deleción en el extremo 3' del gen de topo II alfa en las células INER-37 se realizó un ensayo de 3'RACE. En este sistema se utilizó un oligonucleótido localizado en la posición 3857 nt, que se ubica hacia el extremo 5' del oligonucleótido sentido del fragmento III, utilizado en el RT-PCR, arriba descrito, que al parecer esta alterado. El fragmento amplificado contenía parte de la región traducida (3857-4590 nt) y los 995 nt de la región no traducida (3'UTR). El producto del 3'RACE que se obtuvo en INER-37 fue de aproximadamente 650 pb, mientras que para las células HeLa fue de 1800 pb, que fue utilizada como control (Figura 15).

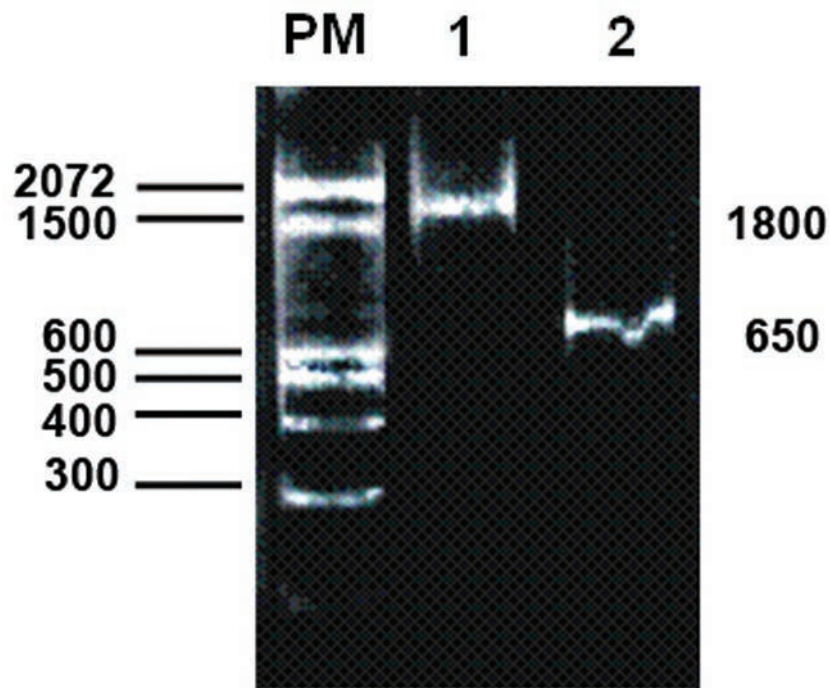


Figura 15. Ensayo de 3'RACE para el RNAm de topo II alfa. Se analizó la región 3' del RNAm de topo II alfa con el sistema 3'RACE y RT-PCR anidado, utilizando un oligo sentido ubicado en el nucleótido 3857 y como antisentido un oligo de 17 bases que era parte del oligo-RT utilizado para sintetizar el cDNA, el cual se ubica desde la región 3'UTR. 1. HeLa, 2. INER-37.

Este resultado mostró que en las células INER-37 el gen de topo II alfa carece de aproximadamente 1150 pb del extremo 3', lo que sugiere que el RNAm de topo II alfa es de menor tamaño al tipo silvestre.

Para comprobar esto último, el RNA total se analizó mediante un ensayo de northern blot utilizando una sonda de cDNA obtenida por PCR del gen de topo II alfa, que se ubica entre los nucleótidos 1246-1539 (sonda ATP). Los resultados mostraron dos RNAm truncados de 4.8 y 2.0 kb, ambos más pequeños respecto al tamaño normal del mensajero silvestre, que es de 6.1-6.3 kb que se encontró en las células HeLa (Figura 16), sin embargo, se observó un barrido en la banda que corresponde al RNAm de 2.0 kb, lo que podría indicar una degradación de este mensajero, lo que sugeriría que es inestable, probablemente a la delección en el extremo 3'.

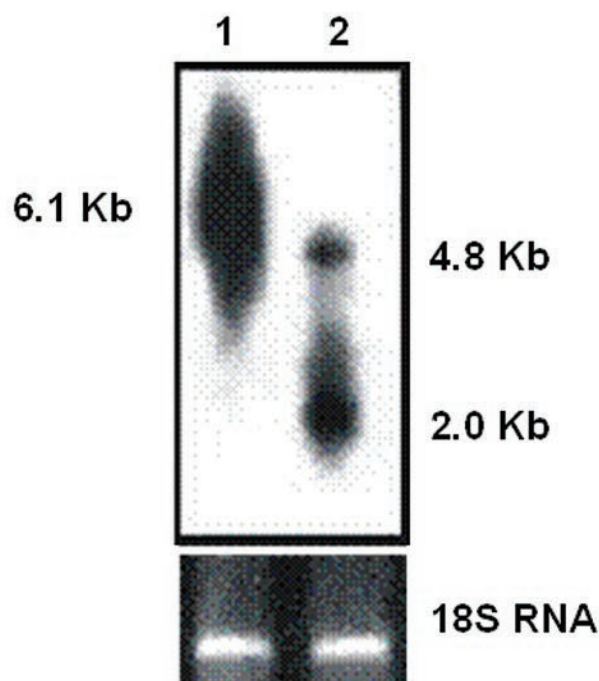


Figura 16. Análisis de Northern blot. El RNA total (10µg) se separó por electroforesis en una gel de agarosa-formaldehído (0.66M) y se transfirió a una membrana de nylon. El RNAm de topo II alfa se detectó con una sonda hecha por PCR (1246-1539nt) obtenida de células HeLa. 1.HeLa, 2. INER-37.

En conjunto estos resultados muestran que las células INER-37 tienen una deleción en la región 3' del RNAm de topo II alfa de aproximadamente 1300 pb, la cual incluye la región traducida así como parte de la región 3' no traducida (3'-UTR).

La amplificación del fragmento II por RT-PCR utilizando un par de oligonucleótidos que se ubican entre los nucleótidos 3519 al 4162, y en el que se obtuvo el fragmento esperado, lo que sugiere que no existe una pérdida de nucleótidos significativa, nos permite situar la deleción en el RNAm de topo II alfa a partir del nucleótido 4162, cercano al lugar en donde en otras líneas celulares se ha descrito una deleción en el RNAm.

XV.5 Topo II alfa truncada de 160 kDa

En las células INER-37 se encontraron dos RNAm, de 4.8 y 2.0 kb, lo que permitió predecir que el transcrito de mayor tamaño puede ser traducido y producir una proteína de aproximadamente 1435 aminoácidos con la región COOH- terminal truncada y un peso aproximado de 160 kDa. El RNAm de 2.0 kb al traducirse daría una proteína de 600 aminoácidos con un peso aproximados de 65 kDa. Se utilizaron tres anticuerpos que reconocen diferentes epítomos. Al utilizar el anticuerpo que reconoce un epítopo en la región interna de la topo II alfa (Sta. Cruz, S-20), se identificó una proteína de aproximadamente 160 kDa, de menor tamaño que el producto observado en las células HeLa, que fue de 170 kDa (Figura 17). Este anticuerpo no detectó otro péptido. Para corroborar que el COOH- terminal estaba truncado, se utilizó un anticuerpo que reconoce un epítopo que se encuentra cercano a la región COOH- terminal de la topo II alfa (Sta. Cruz, K-19). El resultado reveló que en las células INER-37 el anticuerpo no reconoció ninguna proteína, en contraste, en las células HeLa se identificó una proteína de 170 kDa, este resultado mostró que la topo II alfa en las células INER-37 estaba truncada en la región COOH-terminal. El mismo resultado se obtuvo cuando se utilizó un anticuerpo anti-topo II alfa que reconoce los últimos 16 aminoácidos de la región COOH-terminal (TopoGen, Columbus, Ohio). El análisis de la proteína mostró que las células INER-37 expresan una proteína topo II alfa truncada de 160 kDa, la cual al parecer perdió por lo menos 96 aminoácidos de la región COOH-terminal. En esta región se encuentra la señal de localización nuclear ($NLS_{1454-1497}$), estos datos concuerdan con la presencia de la topo II alfa en la región citoplásmica en las células INER-37.

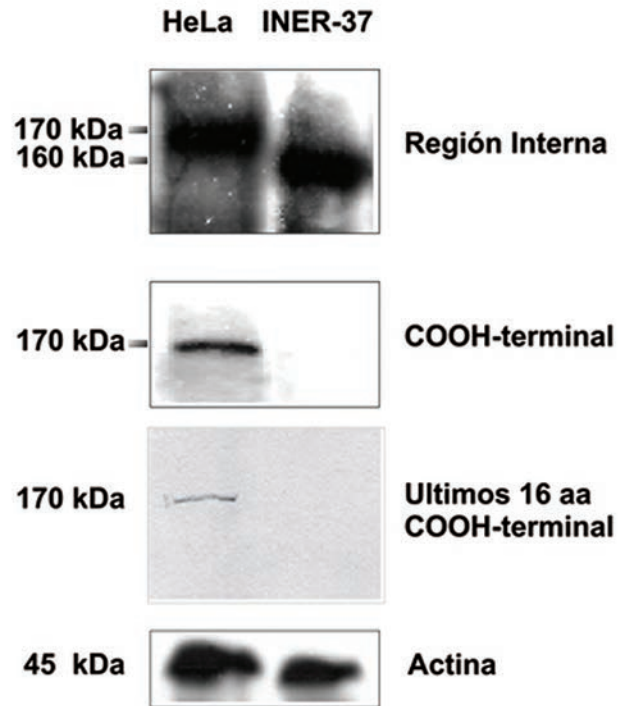


Figura 17. Análisis por Western Blot de topo II alfa en extractos totales de células INER-37 y HeLa. Sesenta microgramos de proteína de extracto total de células INER-37 y HeLa se separaron en un SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectaron con anticuerpos policlonales de cabra anti-topo II alfa que reconocen un epítipo de la región interna (S-20) y un epítipo en la región COOH-terminal (K-19), se trabajaron a una dilución de 1:100. Se utilizó como control un anticuerpo anti-actina.

XVI. DISCUSION

Las células tumorales pueden desarrollar resistencia a los venenos de topo II por la sobreexpresión de los genes *mdr-1* y *mrp-1-6* ⁽²⁴⁰⁾, o bien por la disminución de la concentración o la alteración de la estructura de la enzima blanco por mutaciones. La resistencia a los venenos de topo II se ha correlacionado con una disminución en los niveles de topo II alfa o con mutaciones que afectan la actividad catalítica de la enzima ⁽²⁴⁴⁾. También se ha descrito que la presencia de la topo II alfa en el citoplasma confiere resistencia a los venenos de topo II ^(230,235,239,241). Se han reportado previamente, siete líneas celulares tumorales humanas con la topo II alfa en el citoplasma. Entre estas, se incluyen tres líneas de cáncer de pulmón (H209/V6, H209/VP y H69/VP), dos líneas celulares de cáncer de mama (T47D/VP y MCF-7/VP) y dos líneas celulares obtenidas de leucemias (HL60/MX2 y CEM). Todas estas líneas celulares fueron obtenidas mediante un proceso de selección a venenos de topo II, como etopósido y mitoxantrona, siendo la única excepción la línea celular CEM, que fueron derivadas de un paciente con leucemia aguda y mostraron una baja sensibilidad a los venenos de topo II. En estas líneas celulares, el gen de topo II alfa presenta una extensión en la región exónica como resultado de un splicing alternativo, inserciones, mutaciones y deleciones, lo cual resultó en alteraciones en la región 3' del gen, que derivó en la traducción de proteínas truncadas en la región COOH-terminal y la consecuente pérdida de una de las dos SLN presentes en esta región ⁽²³⁰⁻²³⁸⁾. En este trabajo, se describe la caracterización de la línea celular de cáncer de pulmón INER-37, de la variedad células no pequeñas (NSCLC), que presentó una resistencia innata a etopósido. En esta línea celular la resistencia al etopósido se asoció con la presencia de la topo II alfa en el citoplasma. Un análisis más profundo mostró que las células INER-37 tienen una deleción en el gen de topo II alfa, que da como resultado la presencia de dos transcritos de 4.8 y 2.0 kb, a diferencia del transcrito silvestre, que es de 6.1 kb. El RNAm de 4.8 (con una pérdida de 1.3 kb, que incluye la 3'-UTR), se traduce en una proteína truncada de 160 kDa que se localiza en el citoplasma. En esta proteína truncada de 160 kDa, al menos 96 aminoácidos de la región COOH-terminal no están presentes y por lo tanto carece de la NLS₁₄₅₄₋₁₄₉₇, al igual que las líneas celulares antes mencionadas, en donde la NLS₁₄₅₄₋₁₄₉₇ esta incompleta o ausente.

Las células INER-37 mostraron una resistencia incrementada al etopósido y al tenipósido, pero no presentaron una resistencia a doxorubicina, ciclofosfámda, 5-fluorouracilo o metotrexate. Este patrón de resistencia correlacionó con la falta de expresión del gen *mdr-1*. Sin embargo, si se expresaron los genes *mrp-1* y *gst-m1*. El producto de estos genes, las proteínas MRP-1 y GST-M1, pueden contribuir a la resistencia de varios fármacos al expulsarlos de la célula (MRP-1) o inactivarlos (GST-M1), o bien conjugarlos un glutatión y posteriormente ser reconocidas y expulsadas de la célula (MRP-1/GST-M1), sin embargo, no se ha asociado a MRP-1 con la resistencia a etopósido o

tenipósido, no obstante no se puede descartar como un factor que ayude a las células INER-37 a ser resistentes a etopósido y tenipósido. La GST-M1 puede transferirle un glutation a ambos fármacos y ser en parte, la responsable de la resistencia en esta línea celular.

El fenotipo de topo II alfa citoplásmica se debe a mutaciones y deleciones en la región 3' del gen. Es esta región se encuentran las secuencias que codifican las dos señales de localización nuclear bipartitas ($NLS_{1259-1296}$ y $NLS_{1454-1497}$) y la afectación de al menos una de ellas, principalmente la $NLS_{1454-1497}$, disminuye la concentración de la enzima en el núcleo ⁽¹²⁰⁾. Ya se discutió que existen varias líneas celulares con la topo II alfa citoplásmica, varias de las cuales presentan grandes deleciones en el extremo 3' del gen y esto resulta en una pérdida de al menos 109 aminoácidos de la región COOH-terminal (Tabla II). La presencia de deleciones en esta región del gen de topo II alfa, al parecer se debe a la presencia de una zona de inestabilidad genética, un hot spot, entre el exón 33 y el 35 ⁽²³⁶⁾. En este sitio se encuentran presentes secuencias *Alu*, estas secuencias incrementan el número de eventos de recombinación en esta región y aumentan inestabilidad de la región.

De entre las líneas celulares en donde la región 3' del RNAm de topo II alfa esta afectada, las células INER-37 son muy parecidas a las células HL60/MX2, porque ambas líneas celulares presentan una deleción de 1.3 kb que afecta a la región codificante del extremo 3' y también a la UTR (*untranslated region*) dando como resultado un transcrito de 4.8 kb. En las células HL60/MX2 el transcrito que esta deletado se origina por un splicing alternativo del RNAm, que da como resultado la pérdida de los últimos 108 residuos de aminoácidos, los cuales son reemplazados por 13 residuos nuevos ^(230,233). No obstante, no se conoce la razón por la cual las células INER-37 presentan esta deleción en el gen de topo II alfa, por lo que es necesario determinar si existe algún rearrreglo, o bien si esto ocurre en el gen o solo en el RNAm, la presencia de alguna mutación que presente un codón de paro y si hay la presencia de aminoácidos nuevos en la proteína de 160 kDa.

A pesar de que las células INER-37 presentan la topo II alfa de 160 kDa en el citoplasma, esta enzima es completamente activa. El extremo COOH se sabe que no es necesario para la actividad de la topo II alfa, por lo que aún cuando la enzima carezca de esta región mantiene su actividad catalítica. Sin embargo, el extremo COOH contiene residuos que son fosforilados y que son importantes para regular la actividad de la enzima. La topo II alfa tiene su pico máximo de expresión y actividad en la fase G2/M del ciclo celular, así también el pico máximo de fosforilación es en esta fase, por lo que alteraciones en la fosforilación de la enzima puede afectar su actividad. En las células INER-37, la actividad de desenrollamiento y decatenación de la topo II se encuentra

sin alteración, sin embargo, la topo II alfa no solo tiene una función catalítica, sino también estructural, por lo que se tiene que determinar con mayor fineza si existe alguna alteración en la actividad de la topo II alfa y en su participación estructural en los cromosomas, dada por la pérdida de sitios de fosforilación,

La topo II alfa es esencial para la mitosis en células eucariontes. Durante la mitosis la topo II alfa lleva a cabo la separación de las cromátidas hermanas, así como los liberar los enrollamientos en el DNA generados durante la duplicación y en la interfase de G2. Cuando se silencia la expresión de topo II alfa con RNAi en células eucariontes, da como resultado una mala segregación de los cromosomas y defectos en la condensación. En las células tumorales que presentan la topo II alfa fuera del núcleo, se ha reportado que los eventos mitóticos son llevados a cabo por la topo II alfa citoplásmica, la cual probablemente interaccione con la cromatina después del desensamble de la envoltura nuclear. No obstante, no todas las funciones nucleares son eficientemente compensadas: por ejemplo, en las células H69/VP el cariotipo es poliploide, lo que sugiere que la localización citoplásmica de topo II alfa aumenta el número de eventos de no-disyunción entre los cromosomas ⁽²⁴²⁾. Un estudio realizado en el laboratorio mostró que las células INER-37 presentaron poliploidía con numerosos cromosomas acrocéntricos, lo que apoya el papel tan importante que tiene la topo II alfa en la segregación de los cromosomas en la mitosis. Es importante hacer notar que la actividad de esta enzima no es compensada por la topo II beta o por alguna otra enzima en la célula.

La explicación para la resistencia mediada por la topo II alfa citoplásmica se puede explicar de dos formas: la primera es que la enzima citoplásmica actúe como una barrera que impida la entrada del fármaco al interior del núcleo, ya que el fármaco se puede unir a la enzima sin necesidad de que este presente el DNA y de esta forma secuestrar al fármaco; la segunda es que el fenotipo de la topo II alfa en el citoplasma es similar al fenotipo en el que la expresión y la proteína está disminuida en el interior del núcleo, de forma que aunque el fármaco logre ingresar al núcleo, la concentración de la enzima va a estar disminuida, por lo que el número de complejos ternarios y por lo tanto la cantidad de complejos de corte estabilizados por la actividad del fármaco será muy pequeña, así como los cortes de doble cadena en el DNA generados, por lo que serán arreglados por los sistemas de reparación de la célula.

Una observación interesante es que todas las líneas celulares con mutaciones en la región 3' del gen de topo II alfa fueron obtenidas mediante un proceso de selección a venenos de topo II, siendo la única excepción las células CEM. Estas células fueron derivadas de un paciente con leucemia aguda y mostraron una baja sensibilidad a los venenos de topo II. En este trabajo, las células INER-37 son la primera evidencia de una línea celular humana de cáncer de pulmón en donde una mutación afecta la región 3' de

gen de topo II alfa, resultando en la adquisición de la resistencia innata a los venenos de topo II. La importancia de las mutaciones en la región 3' del gen de topo alfa *in vivo* no se conoce del todo, sin embargo, se publicó un reporte en el que la localización citoplásmica de la topo II alfa tuvo un impacto negativo en el tratamiento quimioterapéutico en niños con leucemia linfoblástica aguda ⁽²⁴³⁾, ya que los niños que presentaron positividad para la topo II alfa citoplásmica, tuvieron una menor sobrevida, comparada con aquellos que tuvieron la topo II alfa en el núcleo, que fue mucho mayor (34 meses vs 110 meses). Esta observación sugiere la importancia que tiene la topo II alfa citoplásmica en el tratamiento de la leucemia, esto mismo podría estar sucediendo en otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, por lo que es importante el análisis de la incidencia de topo II alfa citoplásmica.

Durante el ciclo celular, la expresión del RNAm de topo II alfa aumenta de 15-16 veces durante la fase S, con el pico máximo en la fase G2/M y rápidamente disminuye después de mitosis. En las células HeLa estas variaciones en el RNAm de topo II alfa se asocian con cambios significativos en la estabilidad del transcrito, haciéndolo más estable ⁽¹⁰⁵⁾. Evidencias recientes muestran que la estabilidad del RNAm de topo II alfa está regulado por la interacción de complejos de proteínas que se unen a la región UTR-3' y que son sensibles al cambio en el potencial redox ⁽¹⁰⁵⁾, por lo que las deleciones en la región UTR del RNAm de topo II alfa pueden conferir una expresión constitutiva y una alteración durante el ciclo celular. Ya que las células INER-37 tienen una deleción en el RNAm de topo II alfa que afecta también a la UTR-3', resultaría interesante analizar si en estas células el transcrito de topo II alfa es menos estable por la ausencia de esa región y analizar si existe algún cambio en la expresión del gen.

Existen varias evidencias que muestran que la topo II alfa interacciona con dos importantes reguladores del ciclo celular, p53 y Rb. La proteína p53 regula la actividad de la topo II alfa y Rb inhibe la actividad de topo II alfa en la fase G1, pero la interacción entre ambas proteínas en la fase G2/M aumenta la actividad de topo II alfa. Por lo que resultaría muy interesante analizar si estas interacciones se ven alteradas, dada la deleción que está en la región 3' del RNA de topo II alfa y que como consecuencia de ellos la estabilidad y sobre todo la actividad de la enzima en el ciclo celular se vea afectada, y esto podría ser un paso clave en el proceso de tumorigenesis en algunos tumores. Además, las células que presentaran este tipo de mutaciones en el gen de topo II alfa tendrían una ventaja sobre otras células tumorales, ya que tendrían la capacidad de resistir la acción citotóxica de los venenos de topo II.

El fenotipo de topo II alfa citoplásmica hasta el momento se ha descrito en siete líneas celulares, incluida INER-37, de las cuales cuatro de ellas son de cáncer de pulmón (Tabla II). Ningún mecanismo de resistencia ha demostrado tener un papel

relevante en los tumores de pulmón, como *mdr-1*, *mrp's*, *lrp* o *bcrp*. También se ha propuesto que sean las alteraciones en Topoisomerasas, del tipo I y II, las que sean las responsables de esta resistencia observada en cáncer de pulmón. Lo que sugiere que no existe un mecanismo que por si solo sea el responsable de la resistencia, sino más bien es un fenómeno multifactorial, en donde varios mecanismos de resistencia pueden estar presentes. Basado en esto proponemos que se debería de analizar el fenotipo de topo II alfa citoplásmica en biopsias de tumores de pulmón y determinar la frecuencia con la que se presenta en este tipo de cáncer, y determinar si la topo II alfa citoplásmica puede usarse como un marcador de resistencia ⁽²⁴⁵⁾. Por otro lado, también permitiría determinar un esquema quimioterapéutico adecuado a las características del tumor, en donde no se incluyan los venenos de topo II ⁽²⁴⁶⁾.

Tabla II. Mutaciones en el extremo 3' del gen de topo II alfa asociadas con resistencia

Tipo Celular	Línea celular	Nucleótido	Aminoácido	Fármaco	Referencia
Pulmón	H209/v6	4267-5256	1423-1531	Etopósido	Miski y Cole, 1995
	4267-4952	1424-1531	Etopósido	Yu et al, 1997	Pulmón
Pulmón	H69/VP	4468-4476	1490-1492	Etopósido	Wessel et al, 1997
Leucemia	HL60/MX2	4267-5357	1424-1531	Mitoxantrona	Harper et al, 1995
Leucemia	CEM	4267-5357	1424-1531	Etopósido	Mo et al, 1997
Pulmón	H209/VP	4267-4468	1423-1531	Etopósido	Mirski et al, 2000
Mama	MCF-7/VP	3197-3811	1066-1270	Etopósido	Matsumoto et al, 1997
Mama	T47/VP	4265-4464	1422-1487	Etopósido	Matsumoto et al, 2001
Pulmón	INER-37	4162-->		Etopósido	Este reporte

XVII. CONCLUSIONES

Las células INER-37 presentan una resistencia incrementada a etopósido y tenipósido que correlaciona con la presencia de la topo II alfa en el citoplasma.

Existe una delección en el extremo 3' del gen de topo II alfa que da como resultado una proteína truncada de 160 kDa.

La actividad catalítica de topo II alfa en las células INER-37 permanece sin alteraciones aparentes, a pesar de su localización citoplásmica.

Los genes *mrp-1/gst-m1* se expresan en las células INER-37, sin embargo la contribución de estos en la resistencia de estas células al etopósido y tenipósido no fue descartada.

XVIII. PERSPECTIVAS

La topo II alfa en el citoplasma es uno de los mecanismos de resistencia a venenos de topo II que se han descrito en líneas celulares, sin embargo este mecanismo ha sido poco estudiado *in vivo*, por lo que es necesario analizar su incidencia en pacientes con cáncer de pulmón, o cualquier otro tipo de cáncer. Ya se vio que en leucemias en niños, la presencia de la topo II alfa en el citoplasma es un factor de mal pronóstico para los pacientes. Por lo que serviría de análisis para diagnóstico pronóstico.

Por otro lado el análisis de la topo II alfa citoplasmica, en el contexto de la vida de la célula, es un campo fértil de estudio. Dada la importancia que tiene la topo II en la vida celular, por su papel en el metabolismo del DNA (duplicación, transcripción, segregación de los cromosomas en la mitosis), sería interesante determinar si existen elementos que sustituyen a la enzima y llevan a cabo su actividad, o bien, si es la misma topo II alfa truncada la que lo lleva a cabo, cuál es el mecanismo por el cual puede acceder al núcleo y llevar a cabo su función.

El extremo carboxilo de la topo II alfa, no es esencial para la actividad catalítica de la enzima, sin embargo en esta región se encuentran la mayoría de los sitios de fosforilación, que al parecer son importantes para regular la actividad, así como su traslocación al núcleo. La topo II alfa de INER-37 carece de esta región de la proteína, por lo que sería interesante estudiar a detalle cuales son los sitios de fosforilación que se ven alterados y cuál es su significado biológico.

Las células INER-37 presentan a la topo II alfa en el citoplasma y esto le confiere una resistencia elevada a etopósido y tenipósido. Estas células crecen en monocapa, sin llegar a la confluencia. Sin embargo, cuando las células llegan a confluencia (más del 70%), estas se sensibilizan a la actividad del etopósido, lo que resulta en un aumento en la tasa de apoptosis. Al analizar a las células INER-37 en confluencia, por inmunocitoquímica, se observó que la mayoría de la topo II alfa se localizaba en el núcleo y no en el citoplasma como en las células en baja confluencia (menos del 50%). La topo II alfa tiene dos señales de localización nuclear y dos de exportación nuclear, las cuatro se encuentran localizadas en el extremo carboxilo. En células en proliferación la topo II alfa se localiza en el núcleo y su traslocación al núcleo se debe a la interacción de la enzima con las importinas α 1-3 y β . El proceso de exportación de la topo II alfa al núcleo es mediado por su interacción con la exportina y con CRM1. En las células que están proliferando la exportación del núcleo al citoplasma se encuentra inhibida y por lo tanto la topo II alfa se mantiene en el núcleo. En este contexto sería importante definir cuál es el mecanismo por el cual la topo II alfa en INER-37 puede traslocarse al núcleo, aún cuando tenga afectado el extremo carboxilo. Una hipótesis podría ser

que la otra señal de localización nuclear no este afectada (se ha reportado que la pérdida de esta señal no es significativa en la localización de la enzima en el núcleo, ya que cuando esta señal se pierde, solo el 10% de la enzima se ubica en el citoplasma) y esta en conjunto con la fosforilación de algún sitio cercano a ella puedan ser suficientes para que la enzima se trasloque al núcleo. Además de analizar si las proteínas relacionadas con la importación de la topo II alfa se encuentra funcionales.

XIX. REFERENCIAS

1. Cho WCS. Contribution of oncoproteins to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer* 2007, 6:25.
2. Cancer Control. Knowledge into action. WHO guide for effective programmes. World Health Organization 2006.
3. WHO 2006. Cancer. World Health Organization.
4. WHO 2004. Deaths by cause, sex and mortality stratum. World Health Organization.
5. Lung Cancer Facts (Women). National Lung Cancer Partnerships 2006.
6. Ruíz-Godoy LM, Rizo P, Sánchez F, Osornio A, García C and Meneses-García A. *BMC Cancer* 2007, 7 (Suppl. 1): A29.
7. Malvezzi M, Bosetti C, Chatenoud L, Rodríguez T, Levi F, Negri E and La Vecchia C. *Annals of Oncology* 2004, 15: 1712-1718.
8. Bellamy TW. Multidrug resistance in human tumors. *Current Opinion Oncol* 1990; 2: 1126-1132.
9. Beck WT, Dalton WS. Mechanisms of drug resistance. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA Ed. *Cancer, principles and practice of oncology*. 5th. Ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997. p. 498-512.
10. Chu E, DeVita VT. Principles of cancer management: chemotherapy. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Ed. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 2001. p. 289-386.
11. Paredes A, Blanco JL y Echenique-Elizondo. Expression of multidrug resistance (MDR)-associated proteins in solid tumors. *Cir Esp* 2006; 79(4):202-214.
12. Skipper HE, Simpson-Herren L. Relationship between tumor stem cell heterogeneity and responsiveness to chemotherapy. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Ed. *Important advances in oncology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1985. p. 63-77.
13. Nishio K, Nakamura T, Koh Y. Drug resistance in lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 109-115.
14. Miller AB, Hoogstrate B, Stquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-214.
15. Carney DN, Shepherd FA. Treatment of SCLC: chemotherapy. En: Hansen HH, Ed. *Textbook of lung cancer*. London: Martin Dunitz; 2000. p. 261-272.
16. Shepherd FA, Carney DN. Treatment of NSCLC: chemotherapy. En: Hansen HH, Ed. *Textbook of lung cancer*. London: Martín Dunitz; 2000. p. 213-242.
17. Doyle LA. Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells. *Semin Oncol* 1993; 20: 236-237.
18. Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 912-920.

19. Koomagi R, Mattern J, Volm M. Glucose-related protein (GRP78) and its relationships to the drug resistance proteins P170, GST-pi, LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 4333-4336.
20. Bradshaw D, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3674-3690.
21. Duchesne MG. Fundamental bases of combined therapy in lung cancer: cell resistance to chemotherapy and radiotherapy. *Lung Cancer* 1994; 10 Suppl 1: S67-S72.
22. Dalton WS. Overcoming the Multidrug-resistant phenotype. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenverg SA. Ed. *Cancer, principles and practice on oncology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993. p. 2655-2666.
23. Simon MF, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3497-3504.
24. Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 450-458.
25. Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001; 2: 33-42.
26. Morrow ChS, Cowan KH. Mechanisms of antineoplastic drug resistance. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Ed. *Cancer, principles and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company 1993. p. 340-348.
27. Doubre H, Cesari D, Mairovitz A, Benac C, Chanton-Bastaraud S, Dagnon K, Antoine M, Danel C, Bernaudin JF, Fleury-Feith J. Multidrug resistance-associated protein (MRP-1) is overexpressed in DNA aneuploid carcinomatous cells in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Cancer* 2005; 113: 568-574.
28. Berger W, Setinek U, Hollaus P, Zidek T, Steiner E, Elbling L, Cantonati H, Attems J, Gsur A, Micksche M. Multidrug resistance marker P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 355-363.
29. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Monti E, Gariboldi M, Dolfini E, Arancia G. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxico in Vtro* 2002; 16: 389-398.
30. Berger W, Elbling L, Micksche M. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 2000; 88: 293-300.
31. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diammine-dichloroplatinum (II). Metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 20116-20125.
32. Borst P, Evers R, Koel. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1295-1302.
33. Volm M, Mattern J, Samsel B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in resistant non-small-cell lung carcinomas of smoker. *Br J Cancer* 1991; 64: 700-704.

34. Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase II alpha, p-glycoprotein and multidrug resistance protein in small cell and non small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1469-1473.
35. Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000; 64: 221-251.
36. Scagliotti GV, Novello S, Selvagii G. Multidrug resistance in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 5: S83-86.
37. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 430-440.
38. Larsen AK, Escargueil, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 167-181.
39. Denny WA. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 2004; 9: 105-133.
40. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
41. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascitis tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-483.
42. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162.
43. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface p-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983; 221: 1285-1288.
44. Cole SPC, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistance MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5902-5910.
45. Zaman GJR, Flens MJ, Van Leusden MR. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8822-8826.
46. Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 923-934.
47. Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett* 1997; 112: 23-31.
48. Godstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1039-1050.
49. Trock B, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 917-931.

50. Ng I, Lam K, Ng M. Expression of p-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 851-857.
51. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994; 54: 4833-4836.
52. Rappa G, Loico A, Flavell R. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res* 1997; 57: 5232-5237.
53. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewarts AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-1654.
54. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 1994; 54: 357-361.
55. Young LC, Campling BG, Voskolou-Nomikos T. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 673-680.
56. Thomas GA, Barrand MA, Stewart S. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human lung tumours and normal tissue as determined by in situ hybridization. *Eur J Cancer* 1994; 30: 1705-1709.
57. Busse WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 210-213.
58. Young LC, Campling BG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1 and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1798-1804.
59. Scheffer GL, Pijnenborg ACLM, Smit EF. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* 2002; 55: 332-339.
60. Busse WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: S210-213.
61. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
62. Oguri T, Isobe T, Fujitaka K. Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer* 2001; 93: 584-589.
63. Slovak ML, Pelkey Ho J, Cole SPC. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res* 1995; 55: 4214-4219.
64. Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 923-934.

65. Slesina M, Inman EM, Rome LH, Volkmandt W. Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. *Cell Tissue Res* 2005; 321: 97-104.
66. Van Zon A, Mossink MH, Houtsmuller AB, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope. *Exp Cell Res* 2006; 312: 245-255.
67. Mandoky L, Geczi L, Doleschall Z, Bodrogi I, Csuka O, Kasler M, Brak M. Expression and prognostic value of the Lung Resistance-related Protein (LRP) in germ cell testicular tumors. *Anticancer Res* 2004; 24: 1097-1104.
68. Raybarova S, Hajdukova M, Hodorova I, Kocisova M, Boor A, Brabencova E, Kasan P, Biros E, Mojzis J, Mirossay L. Expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and the lung resistance-related protein (LRP) in human lung cancer. *Neoplasma* 2004; 51: 169-174.
69. Marie JP. Drug resistance in hematologic malignances. *Cur Opin Oncol* 2001; 13: 463-469.
70. Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1647-1653.
71. Ikeda K, Oka M, Narasaki F. Lung resistance-related protein gene expression and drug sensitivity in human gastric and lung cancer cells. *Anticancer Res* 1998; 18: 3077-3080.
72. Allikmets R, Schriml L, Hutchinson A. A human plance specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosoma 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998; 58: 5337-5339.
73. Miyake K, Mickley L, Litman T. Molecular cloning of cDNA which are highly overexpress in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 1999; 59: 8-13.
74. Ross D, Yang W, Abruzzo L. Atipycal multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 429-433.
75. Maliepaard M, Van Gastelen MA, De Jong LA. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan selected ovarian tumor cell lines. *Cancer Res* 1999; 59: 4559-4563.
76. Ross DD, Karp JE, Chen TT. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* 1999; 96: 365-368.
77. Kawabata S, Oka M, Soda H. Expression and functional analysis of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3052-3057.
78. Faneyte IF, Kristel PM, Maliepaard M. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1068-1074.

79. Liu LF, Miller KG. Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3487-3491.
80. Heck MM, Hittelman WN, Earnshaw WC. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1086-1090.
81. Tse-Dinh YC, Wong TW, Goldberg AR. Virus- and cell-encoded tyrosine protein kinases inactivate DNA topoisomerases in vitro. *Nature* 1984; 312: 785-786.
82. Durban E, Goodenough M, Mills J, Busch H. Topoisomerase I phosphorylation in vitro and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *EMBO J* 1985; 4: 2921-2926.
83. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 1985; 260: 14873-14878.
84. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 369-413.
85. Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA, Tewey KM, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Wang JC. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA Topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988; 85: 7177-7180.
86. Lang AJ, Mirski SEL, Cummings HJ, Yu Q, Gerlach JH, Cole SPC. Structural organization of the human TOP2A y TOP2B genes. *Gene* 1998; 221: 255-266.
87. Nitiss JL. Investigation of the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1-3: 63-81.
88. Woessner RD, Mattern MR, Mrabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation- and cell cycle dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1991; 2: 209-214.
89. Heck MM, Earnshaw WC. Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2569-2581.
90. Heck MM, Hittelman WN, Earnshaw WC. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc National Academy Sci* 1988; 85: 1086-1090.
91. Bauman ME, Holden JA, Brown KA, Harker WG, Perkins SL. Differential immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II α and β in human tissues and for DNA topoisomerase II b in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 1997; 10: 168-175.
92. Sullivan DM, Latham MD, Ross WE. Proliferation-dependent topoisomerase II content as a determinant of antineoplastic drug action in human, mouse and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3973-3979.
93. Hsiang YH, Wu HY, Liu LF. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *CANCER Res* 1988; 48: 3230-3235.

94. Issacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 121-137.
95. Carpenter AJ, Porter AC. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II alpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5700-5711.
96. Austin CA, Marsh KL. Eukaryotic DNA topoisomerase II β . *Bioessays* 1998; 20: 215-226.
97. Dereuddre S, Delaporte D, Jacquemin-Sablon A. Role of topoisomerase II beta in the resistance of 9-OH-ellipticine-resistant Chinese hamster fibroblasts to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 1997; 57: 4301-4308.
98. Grue P, Grasse A, Sehester M. Essential mitotic function of DNA topoisomerase II a are not adopted by topoisomerase II b in human H69 cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 33660-33666.
99. Isaacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 121-137.
100. Sandri M, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Broggini M, Vikhanskaya F. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4464-4470.
101. Hocchauser D, Stanway CA, Harris AL, Hickson ID. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human topoisomerase II a gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 18961-18965.
102. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 1987; 51: 1079-1090.
103. Magan N, Szremska AP, Isaacs RJ, Stowell KM. Modulation of DNA topoisomerase II alpha promoter activity by members of the Sp (specificity protein) and NF-Y (nuclear factor Y) families of transcription factors. *Biochem J* 2003; 374: 723-729.
104. Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* 1991; 5: 820-826.
105. Adachi N, Nomoto M, Kohno K, Koyama H. Cell-cycle regulation of the DNA topoisomerase II alpha promoter is mediated by proximal CCAAT boxes: possible involvement of acetylation. *Gene* 2000; 245: 49-57.
106. Furukawa M, Uchiumi T, Nomoto M, Takano H, Morimoto RI, Naito S, Kuwano M, Kohno K. The role of an inverted CCAAT element in transcriptional activation of the human DNA topoisomerase II alpha gene by heat shock. *J Biol Chem* 1998; 273: 10550-10555.
107. Morgan SE, Beck WT. Role of an inverted CCAAT element in human topoisomerase II alpha gene expression in ICRF-187-sensitive and resistant CEM leukemic cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59:203-211.

108. Henry JA, Le NM, Nguyen B, Howard CM, Bailey SL, Horick SM, Buchmueller KL, Kotecha M, Hochhauser D, Hartley JA, Wilson WD, Lee M. *Biochemistry* 2004; 38: 12249-12257.
109. Herzog CE, Zwelling LA. Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase II alpha promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 608-612.
110. Kubo T, Kohno K, Ohga T, Taniguchi K, Kawanami K, Wada M, Kuwano M. DNA topoisomerase II alpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide resistant human cancer cells. *Cancer Res* 55: 3860-3864, 1995.
111. Chen G, Templeton D, Suttle DP, Stacey DW. Ras stimulates DNA topoisomerase II alpha through MEK: a link between oncogenic signaling and a therapeutic target. *Oncogene*. 1999 ;18:7149-7160.
112. Sandri M, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Brogginini M, Vikhanskaya F. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4464-4470.
113. Falck J, Jensen PB, Sehested M. Evidence for repressional role of an inverted CCAAT box in cell cycle-dependent transcription of the human DNA topoisomerase II alpha gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 18753-18758.
114. Hopfner R, Mousli M, Gamier JM, Redon R, du Manoir S, Chatton B, Ghyselinck N, Oudet P, Bronner C. Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90 a protein involved in the regulation of the topoisomerase II alpha gene expression. *Gene* 266: 15-23, 2001.
115. Hopfner R, Mousli M, Oudet P, Bronner C. Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase II alpha expression. *Anticancer Res* 2002; 22: 3165-3170.
116. Dingemans AM, Pinedo HM, Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 275-288.
117. Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. 2000.
118. Son YS, Suh JM, Ahn SH, Kim JC, Yi JY, Hur KC, Hong WS, Muller MT, Chung IK. Reduced activity of topoisomerase II in an Adriamycin-resistant human stomach-adenocarcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 41: 353-360.
119. Williams AO, Isaacs RJ, Stowell KM. Down-regulation of human topoisomerase II alpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. *BMC Molecular Biology* 2007; 8:36.
120. Champoux JJ. DNA Topoisomerases: Structure, function and mechanism. *Ann Rev Biochem* 2001; 70: 369-413.
121. Mirski SEL, Gerlach JH, Cole SPC. Sequence determinants of nuclear localization in the α and β isoforms of human topoisomerase II. *Exp Cell Res* 1999; 251: 529-559.

122. Mirski SEL, Bielawski JC, Cole SPC. Identification of functional nuclear export sequences in human topoisomerase II alpha and beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306: 905-911.
123. Turner JG, Engel R, Derderian JA, Jove R, Sullivan DM. Human topoisomerase II α nuclear export is mediated by two CRM-1 dependent nuclear export signals. *J Cell Sci* 2004; 117: 3061-3071.
124. Mirski SEL, Sparks KE, Friedrich B, Köhler M, Mo YY, Beck WT, Cole SPC. Topoisomerase II binds importin α isoforms and exportin/CRM1 but does not shuttle between the nucleus and cytoplasm in proliferating cells. *Exp Cell Res* 2007; 313: 627-637.
125. Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic Topoisomerase II and drugs target to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 159-154.
126. Dickey JS, Osheroff N. Impact of the C-terminal domain of topoisomerase II α on the DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry* 2005; 44: 11546-11554.
127. Zini, N., Santi, S., Ognibene, A., Bavelloni, A., Neri, LM., Valmori, A., Mariani, E., Negri, C., Astaldi-Ricotti, GC, Maraldi, N. M. Discrete localization of different DNA topoisomerases in HeLa and K562 cell nuclei and subnuclear fractions. *Exp Cell Res* 1994; 210: 336-348.
128. Petrov P, Drake FH, Loranger A, Huang W, Hancock R. Localization of DNA topoisomerase II in chinese hamster fibroblast by confocal and electron microscopy. *Exp Cell Res* 1993; 204:73-81.
129. Meyer KN, Kjeldsen E, Straub T, Knudsen BR, Hickson ID, Kikuchi A, Kreipe H, Boege F. Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J Cell Biol* 1997; 136:775-788.
130. Chaly N, Chen X, Dentry J, Brown DL. Organization of DNA topoisomerase II isotypes during the cell cycle of human lymphocytes and HeLa cells. *Chromosome Res* 1996; 4: 457-466.
131. Taagepera S, Rao PN, Drake FH, Gorbsky GJ. DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 8407-8411.
132. Rattner JB, Hendzel MJ, Furbee CS, Muller MT, Bazett-Jones DP. Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol* 1996; 134: 1097-1107.
133. Gorbsky GJ. Cell cycle progression and chromosome segregation in mammalian cells cultures in the presence of the topoisomerase II inhibitors ICRF-187 (ADR-529) and ICRF-159 (razoxane). *Cancer Res* 1994; 54: 1042-1048.
134. Sumner AT. The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Res* 1996; 4: 5-14.

135. Null AP, Hudson J y Gorbsky GJ. Both alpha and beta isoforms of mammalian DNA topoisomerase II associate with chromosomes in mitosis. *Cell Growth and Differentiation* 2002; 13: 325-333.
136. Wells NJ, Fry AM, Guano F, Norbury C, Hickson ID. Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. *J Biol Chem* 1995; 270: 28357-28363.
137. Wells NJ, Hickson ID. Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem* 1995; 231: 491-497.
138. Ackerman P, Glover CV, Osheroff N. Phosphorylation of DNA topoisomerase II by casein kinase II: modulation of eukaryotic topoisomerase II activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ;82:3164-3168.
139. Cardenas ME, Dang Q, Glover CV, Gasser SM. Casein kinase II Phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J* 1992; 11: 1785-1796.
140. Cardenas ME, Walter R, Hanna D, Gasser SM. Casein kinase II copurifies with yeast DNA topoisomerase II and re-activates the dephosphorylated enzyme. *J Cell Sci* 1993; 104: 533-543.
141. Cardenas ME, Gasser SM. Regulation of topoisomerase II by phosphorylation: a role for casein kinase II. *J Cell Sci* 1993; 104 :219-225.
142. Wells NJ, Addison CM, Fry AM, Ganapathi R, Hickson ID. Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alpha protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro. *J Biol Chem.* 1994; 269:29746-29751.
143. Ishida R, Iwai M, Marsh KL, Austin CA, Yano T, Shibata M, Nozaki, Hara A. Threonine 1342 in human topoisomerase II alpha is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem* 1996; 271: 30077-30082.
144. Daum JR, Gorbsky GJ. Casein kinase II catalyzes a mitotic phosphorylation on threonine 1342 of human DNA topoisomerase II alpha, which is recognized by the 3F3/2 phosphoepitope antibody. *J Biol Chem* 1998; 273: 30622-30629.
145. Escargueil AD, Plisov SY, Filhol O, Cochet C y Larsen AK. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem* 2000; 275: 34710-34718.
146. Kimura K, Saijo M, Tanaka M y Enomoto T. Phosphorylation-independent stimulation of DNA topoisomerase II alpha activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 10990-10995.
147. Redwood C, Davies SL, Wells NJ, Fry AM y Hickson ID. Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II alpha in a phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* 1998; 273: 3635-3642.
148. Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, Aebersold RH, Bukowski RM, Hickson ID, Andersen AH, Ganapathi R y Ganapathi MK. Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem* 2003, 278: 12696-12702.

149. Gardiner LP, Roper DI, Hammonds TR y Maxwell A. The N-terminal domain of human topoisomerase II alpha is a DNA-dependent ATPase. *Biochemistry* 1998; 37: 16997-17004.
150. Ishida R, Sato M, Narita T, et al. Inhibition of DNA Topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *J Cell Biol* 1994; 126: 1541-1551.
151. Darby MK, Schmitt B, Jongstra-Bilen J y Vosberg HP. Inhibition of calf thymus type II DNA Topoisomerase by poly (ADP-ribosylation). *EMBO J* 1985; 4: 2129-2134.
152. Zechiedrich EL, Osheroff N. Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J* 1990; 9: 4555-4562.
153. Roca J, Berger JM, Wang JC. On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of double-stranded DNA helices. *J Biol Chem* 1993; 268: 14250-14255.
154. Osheroff N. Role of the divalent cation in topoisomerase II mediated reactions. *Biochemistry* 1987; 26: 6402-6406.
155. Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1983; 258: 15365-15370.
156. Sander M, Hsieh T. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1983; 258: 8421-8428.
157. Zechiedrich EL, Christiansen K, Andersen AH, Westergaard O, Osheroff N. Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry* 1989; 28: 6229-6236.
158. Osheroff N, Shelton ER, Brutlag DL. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *J Biol Chem* 1983; 258: 9536-9543.
159. Lindsley JE, Wang JC. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10485-10489.
160. Baird CL, Harkins TT, Morris SK, Lindsley JE. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13685-13690.
161. Osheroff N. Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. *J Biol Chem* 1986; 261: 9944-9950.
162. Roca J, Wang JC. The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 1992; 71: 833-840.
163. Wang JC. DNA Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews* 2002; 3: 430-440.
164. Takano H, Kohno K, Matsuo K, Matsuda T, Kuwano M. DNA Topoisomerase-targeting antitumor agents and drug resistance. *Anticancer Drugs* 1992; 3: 325-330.
165. Larsen AK, Skladanowski A. Cellular resistance to topoisomerase-targeted drug: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 257-274.

166. Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2000; 64: 221-253.
167. Anhoh T, Ishida R. Catalytic inhibitors of DNA Topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 155-171.
168. Rowe TC, Chen GL, Hsiang YH, Liu LF. DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1986; 46: 2021-2026.
169. Horowitz DS, Wang JC. Mapping the active site tyrosine of Escherichia coli DNA gyrase. *J Biol Chem* 1987; 262: 5339-5344.
170. Worland ST, Wang JC. Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1989; 264: 4412-4416.
171. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 635-692.
172. Baguley BC, Ferguson LR. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 213-222.
173. Kaufmann SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 195-211.
174. Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 233-255.
175. Holden JA. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2001; 1: 1-25.
176. Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res* 1989; 49: 6365-6368.
177. D'arpa P, Beardmore C, Liu LF. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* 1990; 50: 6919-6924.
178. Corbett AH. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. Osheroff N. *Chem Res Toxicol* 1993; 6: 585-597.
179. Howard MT, Neece SH, Matson SW, Kreuzer KN. Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12031-12035.
180. Felix CA. Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 525-535.
181. Kreuzer KN, Cozzarelli NR. Escherichia coli mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J Bacteriol* 1979; 140: 424-435.
182. Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 173-184.
183. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1514-1521.

184. Pommier Y. DNA topoisomerase II inhibitors in: B.A. Teicher. Ed. Cancer therapeutics: Experimental and clinical agents. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997. p. 153-174.
185. Li TK, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 53-77.
186. Andoh T, Ishida R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 155-194.
187. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 167-181.
188. Walker JV, Nittis JL. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest* 2002; 20: 570-589.
189. Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 173-184.
190. Willmore E, Frank AJ, Padget K, Tilby MJ, Austin CA. Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 78-85.
191. Byl JA, Cline SD, Utsugi T, Kobunai T, Yamada Y, Osheroff N. DNA topoisomerase II as the target for the anticancer drug TOP-53: mechanistic basis for drug action. *Biochemistry* 2001; 40: 712-718.
192. Cornarotti M, Tinelli S, Willmore E, Zunino F, Fisher LM, Austin CA, Capranico G. Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases IIalpha (p170) and IIbeta (p180). *Mol Pharmacol* 1996; 50:1463-1471.
193. Froelich-Ammon SJ, Osheroff N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* 1995; 270: 21429-21432.
194. Chow KC, Macdonald TL, Ross WE. DNA binding by epipodophyllotoxins and N-acyl anthracyclines: implications for mechanism of topoisomerase II inhibition. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 467-473.
195. Kingma PS, Burden DA, Osheroff N. Binding of etoposide to topoisomerase II in the absence of DNA: decreased affinity as a mechanism of drug resistance. *Biochemistry* 1999; 38: 3457-3461.
196. Leroy D, Kajava AV, Frei C, Gasser SM. Analysis of etoposide binding to subdomains of human DNA topoisomerase II alpha in the absence of DNA. *Biochemistry* 2001; 40: 1624-1634.
197. Burden DA, Kingma PS, Froelich-Ammon SJ, Bjornsti MA, Patchman MW, Thompson RB, Osheroff N. Topoisomerase II.etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J Biol Chem* 1996; 271: 29238-29244.

198. Lovett BD, Strumberg D, Blair IA, Pang S, Burden DA, Megonigal MD, Rappaport EF, Rebbeck TR, Osheroff N, Pommier YG, Felix CA. Etoposide metabolites enhance DNA topoisomerase II cleavage near leukemia-associated MLL translocation breakpoints. *Biochemistry* 2001; 40: 1159-1170.
199. Bromberg KD, Burgin AB, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II α . *J Biol Chem* 2003; 278: 7406-7412.
200. Fass D, Bogden CE, Berger JM. Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 322-326.
201. Wilstermann AM, Osheroff N. Positioning the 3'-DNA terminus for topoisomerase II-mediated religation. *J Biol Chem* 2001; 276: 17727-17731.
202. Costanzo V, Shechter D, Lupardus PJ, Cimprich KA, Gottesman M, Gautier. An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *J. Mol Cell* 2003; 11: 203-213.
203. Bautista-de Lucio V, Madrid-Marina V, Barrera-Rodriguez R. The molecular biology of topoisomerase II α and its importance in the acquisition of multidrug resistance in cancer. *Rev Oncol* 2002; 4: 170-178.
204. Harker WG, Slade DL, Dalton WS, Meltzer PS, Trent JM. Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res* 1989; 49: 4542-4549.
205. Zwelling LA, Slovak ML, Doroshow JH, Hinds M, Chan D, Parker E, Mayes J, Sie KL, Meltzer PS, Trent JM. HT1080/DR4: a P-glycoprotein-negative human fibrosarcoma cell line exhibiting resistance to Topoisomerase II-reactive drugs despite the presence of a drug-sensitive Topoisomerase II. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1553-1561.
206. Cole SPC, Chanda ER, Dicke FP, Gerlach JH, Mirski SEL. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decrease susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of Topoisomerase II. *Cancer Res* 1991; 51: 3345-3352.
207. Friche E, Danks MK, Schmidt CA, Beck WT. Decrease DNA Topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 4213-4218.
208. Hinds M, Deisseroth K, Mayer J. Identification of a point mutation in the Topoisomerase II gene from human leukemia cell line containing an amsacrine-resistant form of Topoisomerase II. *Cancer Res* 1991; 51: 4729-4731.
209. Evans CD, Mirski SEL, Danks MK, Cole SPC. Reduced levels of Topoisomerase II α and β in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 34: 242-248.
210. Ritke MK, Roberts D, Allan WP, Raymond J, Bergoltz VV, Yalowich JC. Altered stability of etoposide-induced Topoisomerase II-DNA complexes in resistant human leukaemia K562 cells. *Br J Cancer* 1994; 69: 687-697.

211. Zwelling LA, Hinds M, Chan D, Mayes J, Sie KL, Parker E, Silverman L, Radcliffe A, Beran M, Blick M. Characterization of an amsacrine-resistant line of human leukemia cells. Evidence for a drug resistant form of Topoisomerase II. *J Biol Chem* 1989; 264: 16411-16420.
212. Davies SM, Robson CN, Davies SL, Hichson ID. Nuclear Topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J Biol Chem* 1988; 263: 17724-17729.
213. Harker WG, Slade DL, Drake FH, Parr RL. Mitoxantrone resistance in HL-60 leukemia cells: reduced nuclear Topoisomerase II catalytic activity and drug-induced DNA cleavage in association with reduced expression of the Topoisomerase II alpha isoform. *Biochemistry* 1991; 30: 9953-9961.
214. Holden JA, Rolfson DH, Wittwer CT. Human DNA Topoisomerase II: evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues. *Biochemistry* 1990; 29: 2127-2134.
215. Holden JA, Rolfson DH, Wittwer CT. The distribution of immunoreactive Topoisomerase II protein in human tissues and neoplasms. *Oncology Res* 1992; 4: 157-166.
216. Potmesil M, Hsiang YH, Liu L, Bank B, Grossberg H, Kirschenbaum S, Forlenza TJ, Penziner A, Kanganis D. Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA Topoisomerase II. *Cancer Res* 1988; 48: 3537-3543.
217. D'Andrea MR, Mulhaupt HAD, Farber PA, Fogleson PD. Expression of genes for DNA Topoisomerase II alpha and DNA Topoisomerase II beta in human tumours. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1988; 36: 2690.
218. Sullivan DM, Latham MD, Rowe TC, Ross WE. Purification and characterization of an altered Topoisomerase II from drug-resistant chinese hamster ovary cell line. *Biochemistry* 1989; 28: 5680-5687.
219. Glisson B, Grupta R, Smallwood-Kentro S, Ross W. Characterization of acquires epipodophyllotoxin resistance in chinese hamster ovary cell line: loss of drug-stimulated DNA cleavage activity. *Cancer Res* 1986; 46: 1934-1938.
220. Bugg BY, Danks MK, Beck WT, Suttle DP. Expression of a mutant DNA Topoisomerase II in ICRF-CEM human leukemia cells selected for resistance to teniposide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7654-7658.
221. Lee MS, Wang JC, Beran M. Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170 kDa form of the human Topoisomerase II. *J Mol Biol* 1992; 223: 837-843.
222. Danks MK, Warmoth MR, Friche E, Granzen B, Bugg BY, Harker WG, Zwelling LA, Futscher BW, Suttle DP, Beck WT. Single-strand conformational polymorphism analysis of the Mr 170,000 isozyme of DNA Topoisomerase II in human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 55: 1573-1579.

223. Patel S, Fisher LM. Novel selection and genetic characterization of an etoposide-resistant human leukaemic CCRF-CEM cell line. *Br J Cancer* 1993; 67: 456-463.
224. Kohno K, Danks MK, Matsuda T, Nittis JL, Kuwano M, Beck WT. A novel mutation of DNA Topoisomerase II alpha gene in an etoposide-resistant human cancer cell line. *Cell Pharmacol* 1995; 87: 87-90.
225. Kubo A, Yoshikawa A, Hirashima T, Masuda N, Takada M, Takahara J, Fukuoka M, Nakagawa K. Point mutations of the Topoisomerase II alpha gene in patients with small cell lung cancer treated with etoposide. *Cancer Res* 1996; 56: 1232-1236.
226. Campain JA, Gottesman MM, Pastan I. A novel mutant Topoisomerase II alpha present in VP-16 resistant human melanoma cell lines has a deletion of alanine 429. *Biochemistry* 1994; 33: 1327-1332.
227. Wasserman RA, Wang JC. Analysis of yeast DNA Topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug amsacrine. *Cancer Res* 1994; 54: 1795-1800.
228. Patel S, Keller BA, Fisher LM. Mutation at Arg₄₈₆ and Glu₅₇₁ in human Topoisomerase II alpha confer resistance to amsacrine: relevance for antitumor drug resistance in human cells. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 784-791.
229. Danks MK, Schmidt CA, Cirtain MC, Suttle DP, Beck WT. Altered catalytic activity of and DNA cleavage by DNA Topoisomerase II from human leukemic cells selected for resistance to VM-26. *Biochemistry* 1988; 27: 8861-8869.
230. Harker WG, Slade DL, Parr RL, Holguin MH. Selective use of an alternative stop codon and polyadenylation signal within intron sequences leads to a truncated Topoisomerase II alpha messenger RNA and protein in human HL-60 leukemia cells selected for resistance to mitoxantrone. *Cancer Res* 1995; 55: 4962-4971.
231. Wessel I, Jensen PB, Falck J, Mirski SE, Cole SP, Schested M. Loss of amino acid 1490-Lys-Ser-Lys-1492 in the COOH-terminal region of Topoisomerase II alpha in human small cell lung cancer cells selected for resistance to etoposide results in an extranuclear enzyme localization. *Cancer Res* 1997; 57:4451-4454.
232. Mirski SE, Cole SP. Cytoplasmic localization of a mutant M(r) 160,000 topoisomerase II alpha is associated with the loss of putative bipartite nuclear localization signals in a drug-resistant human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1995; 55:2129-2134.
233. Harker WG, Slade DL, Parr RL, Feldhoff PW, Sullivan DM, Holguin MH. Alterations in the topoisomerase II alpha gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II beta enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res* 1995; 55:1707-1716.
234. Yu Q, Mirski SE, Sparks KE, Cole SP. Two COOH-terminal truncated cytoplasmic forms of topoisomerase II alpha in a VP-16-selected lung cancer cell line result from partial gene deletion and alternative splicing. *Biochemistry* 1997; 36:5868-5877.

235. Feldhoff PW, Mirski SE, Cole SP, Sullivan DM. Altered subcellular distribution of topoisomerase II alpha in a drug-resistant human small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* 1994; 54:756-762.
236. Mirski SE, Sparks KE, Yu Q, Lang AJ, Jain N, Campling BG, Cole SP. A truncated cytoplasmic topoisomerase II alpha in a drug-resistant lung cancer cell line is encoded by a TOP2A allele with a partial deletion of exon 34. *Int J Cancer* 2000; 85:534-539.
237. Matsumoto Y, Takano H, Kunishio K, Nagao S, Fojo T. Incidence of mutation and deletion in topoisomerase II alpha mRNA of etoposide and mAMSA-resistant cell lines. *Jpn J Cancer Res* 92: 1133-1137. 2001.
238. Matsumoto Y, Takano H, Kunishio K, Nagao S, Fojo T. Hypophosphorylation of topoisomerase II alpha in etoposide (VP-16)-resistant human carcinoma cell lines associated with carboxy-terminal truncation. *Jpn J Cancer Res* 92: 799-805. 2001.
239. Mo YY, Beck WT. Heterogeneous expression of DNA topoisomerase II alpha isoforms in tumor cell lines. *Oncol Res* 1997; 9: 193-204.
240. Dean M, Allikmets R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 779-785.
241. Vassetzky YS, Alghisi GC, Roberts E, Passer SM. Ectopic expression of inactive forms of yeast DNA topoisomerase II confers resistance to the anti-tumour drug, etoposide. *Br J Cancer* 1996; 73: 1201-1209.
242. Grue P, Grasser A, Sehested M, Jensen PB, Uhse A, Straub T, Ness W, Boege F. Essential mitotic functions of DNA topoisomerase II alpha are not adopted by topoisomerase II beta in human H69 cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 33660-33666.
243. Gall E, Moulinoux JP, Leray E, Goasguen JE. Impact of topoisomerase II alpha spermine on the clinical outcome of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 479-486.
244. Nittis JL, Beck WT. Antitopoisomerase drug action and resistance. *Eur J. Cancer* 1996; 32A: 958-966.
245. Jorgensen JT, Nielsen KV, Ejlersen V. Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer. *Oncologist* 2007; 4: 397-405.
246. Dimov ND, Zynger DL, Luan C, Kozłowski JM, Yang XJ. Topoisomerase II alpha expression in testicular germ cell tumors. *Urology* 2007; 69: 955-961.