

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 137 número 297 del libro
Correspondiente a 30 OCT. 2002
Sevilla,



El Jefe del Negociado de Tesis

Rosa Durán

T.D. 558

Universidad de Sevilla
Departamento de Biología Celular

TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN INDUCIDOS POR RADIACIÓN IONIZANTE

Nuria María Pastor Carrillo

Tesis Doctoral

2002

T.D. 558





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TS ~~123~~
120

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Topoisomerasas y Reparación del daño en el ADN inducido por radiación ionizante sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- + Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Pastor Carrillo, Nuria

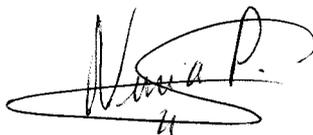
Firmado:

Sevilla, a 27 de Enero de 1992.

TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN INDUCIDOS POR RADIACIÓN IONIZANTE

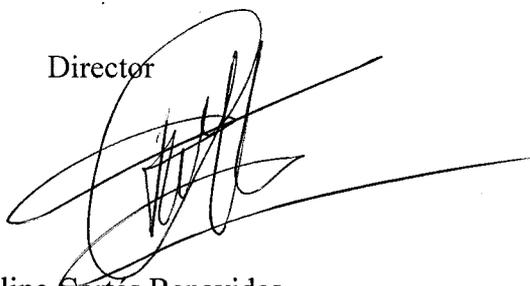
*Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por la Licenciada*

Nuria María Pastor Carrillo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nuria P.' with a stylized flourish underneath.

Sevilla, 2002

Director

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Dr. Felipe Cortés Benavides
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Sevilla

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

1.1 LA RADIACIÓN IONIZANTE

1.1.1 Efectos biológicos de la radiación ionizante

1.1.2 Lesiones producidas por la radiación ionizante

1.2 MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN

1.2.1 Respuesta molecular inicial al daño por radiación ionizante

1.2.2 Reparación del daño en el ADN

1.2.2.1 Reparación de las roturas de cadena simple (SSB)

1.2.2.2 Reparación de las roturas de doble cadena (DSB)

1.2.2.2.1 Reparación de las DSBs por recombinación homóloga (HRR)

1.2.2.2.2 Reparación de las DSBs por recombinación no-homóloga o ilegítima (NHEJ)

1.3 LÍNEAS CELULARES RADIOSENSIBLES DE MAMÍFEROS

TOPOISOMERASAS DE ADN

1.4 TOPOLOGÍA DEL ADN

1.5 TOPOISOMERASAS DE ADN

1.5.1 Topoisomerasa I de mamíferos

1.5.2 Topoisomerasas II de mamíferos

1.6 CICLO CATALÍTICO DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN DE MAMÍFEROS

1.7 PAPEL BIOLÓGICO DE LAS TOPOISOMERASAS

1.7.1 Topoisomerasas y el superenrollamiento intracelular del ADN

1.7.2 Topoisomerasas en replicación

1.7.3 Topoisomerasas en transcripción

1.7.4 Topoisomerasas en recombinación

1.7.5 Topoisomerasa II en el mantenimiento de la estructura genómica

1.7.6 Topoisomerasas en reparación del daño en el ADN

a) Implicación en una fase previa a la reparación

b) Implicación en la transcripción de genes de respuesta al daño

c) Implicación en la reparación por recombinación

1.8 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE LAS TOPOISOMERASAS A LO LARGO DEL CICLO CELULAR EUCARIÓTICO

1.8.1 Topoisomerasa II y condensación cromosómica

1.8.2 Topoisomerasa II y segregación cromosómica

1.9 INHIBIDORES DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN

1.9.1 Venenos de Topoisomerasas

1.9.2 Inhibidores catalíticos de las Topoisomerasas

OBJETIVOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO

2.2 ESTUDIOS DE SINCRONIZACIÓN CELULAR EN DISTINTAS FASES DEL CICLO

2.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD RELATIVA DE TOPOISOMERASA I Y II TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE

2.3.1 Sincronización y tratamiento

2.3.2 Extracción de proteínas nucleares

2.3.3 Ensayo de determinación de actividad Topoisomerasa

2.3.4 Determinación de la cantidad relativa de enzima Topoisomerasa

2.3.4.1 Análisis inmunocitoquímico

2.3.4.2 Inmunotransferencia o western blot

2.4 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA II, BUFALIN E ICRF-193

2.4.1 Ensayo de citotoxicidad

2.4.2 Estudio de inhibición de la actividad Topo II

2.4.3 Análisis de producción de aberraciones cromosómicas

2.4.4 Producción de células endorreduplicadas

2.4.5 Cuantificación del daño en el ADN, producido por bufalin e ICRF-193, mediante la electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo del cometa”

2.5 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y REPARACIÓN DEL MISMO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL INHIBIDOR DE TOPO II BUFALIN

2.5.1 Estudio dosimétrico del daño a tiempo cero

2.5.2 Reparación del daño inducido por la radiación ionizante

2.5.3 Modulación de la reparación tras el tratamiento combinado de rayos X más el inhibidor bufalin

2.5.4 Cuantificación de daño inicial mediante electroforesis de campo pulsante

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.2 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD RELATIVA DE TOPOISOMERASA I Y II TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE

3.2.1 Modulación de la actividad Topoisomerasa I y II tras la irradiación en G1

3.2.2 Análisis inmunocitoquímico para la determinación de la expresión de las Topoisomerasas

3.2.3 Análisis de la cantidad celular total de Topoisomerasas

3.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA II, BUFALIN E ICRF-193

3.3.1 Ensayos de citotoxicidad mediante la técnica de la tinción con sulforrodamina B (SRB)

3.3.2 Efecto del ICRF-193 y del bufalin sobre la actividad catalítica Topo II

3.3.3 Análisis de la producción de aberraciones cromosómicas

3.3.4 Producción de células endorreduplicadas

3.3.5 Ensayo del cometa para la cuantificación de daño en el ADN producido por estos compuestos

3.4 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y REPARACIÓN DEL MISMO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL INHIBIDOR DE TOPO II BUFALIN

4. DISCUSIÓN

4.1 TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO POR RADIACIÓN

4.2 TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO QUÍMICO; PAPEL EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

4.3 REGULACIÓN DE LAS TOPOISOMERASAS POR EL GEN P53 DESPUÉS DEL DAÑO EN EL ADN

4.4 LÍNEAS RADIOSENSIBLES COMO HERRAMIENTA FUNDAMENTAL PARA ESTOS ESTUDIOS

4.5 INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS COMO POSIBLE ALTERNATIVA

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

La estructura primaria del ADN está sometida a constantes modificaciones químicas, tanto en la estructura como en la secuencia de los nucleótidos constituyentes, que amenazan su integridad. Dichas alteraciones se producen principalmente como consecuencia de errores introducidos durante la replicación, recombinación y reparación del mismo. Asimismo, determinadas condiciones de temperatura y pH pueden dar lugar a una cierta inestabilidad genómica. Igualmente, el ADN reacciona fácilmente con gran variedad de compuestos químicos y un menor número de agentes físicos, muchos de los cuales están presentes en el medio ambiente. Cada una de las modificaciones de la estructura molecular del material genético capaz de alterar el funcionamiento normal de la célula se considera como daño al ADN, y puede ser clasificado como daño endógeno o exógeno (figura 1).

<u>Agente</u>		<u>Lesión</u>
UV		Dímeros de pirimidina
Radiación ionizante Bleomicina		Roturas de cadena (dobles y simples)
Agentes alquilantes		Alquilación de las guaninas
Alquilantes Radiación ionizante		Enlace cruzado ADN-proteína Daño en las bases
Cisplatino / alquilantes Radiación ionizante		Enlace cruzado ADN-ADN
Antraciclina		Intercalación
m-AMSA		Rotura mediada por la topoII
Camptotecina		Rotura mediada por la topoI

Figura 1. Principales tipos de lesiones producidas en el ADN por radiación ionizante y compuestos genotóxicos.

Los principales agentes endógenos que dañan el ADN suelen ser enzimas o los productos de las mismas, que dan lugar a despurinaciones, despirimidinaciones, daño en las bases, producción de aductos o roturas de cadena. Los agentes oxidantes se producen en la

célula por distintos procesos asociados con el metabolismo aeróbico, por lo que el daño oxidativo parece ser el daño endógeno más significativo e inevitable, con una frecuencia estimada de 10^4 lesiones por célula y día en humanos. Por otro lado, el ADN también puede ser dañado por diferentes agentes exógenos físicos o químicos.

1.1 LA RADIACIÓN IONIZANTE

Entendemos por radiación todo agente físico que se propaga a través del espacio cediendo energía al medio que atraviesa. La radiación ionizante es aquella radiación que posee la propiedad de arrancar electrones de los átomos de las moléculas con las que interactúa, formando iones y alterando así las propiedades fisico-químicas del medio atravesado.

Existen dos tipos de radiaciones ionizantes, electromagnéticas y corpusculares. Dentro de las primeras se incluyen los rayos X, que liberan su energía en forma de fotones sin carga ni masa dando lugar a la formación de moléculas excitadas o ionizadas. La energía de los fotones se transmite por colisión, generalmente con electrones de otros átomos. Tras la colisión, un electrón puede pasar a un orbital más alejado del núcleo (excitación), o más comúnmente salir del átomo con alta velocidad y energía (ionización). Esta energía se disipa en el medio ionizando y excitando los átomos con los que interacciona.

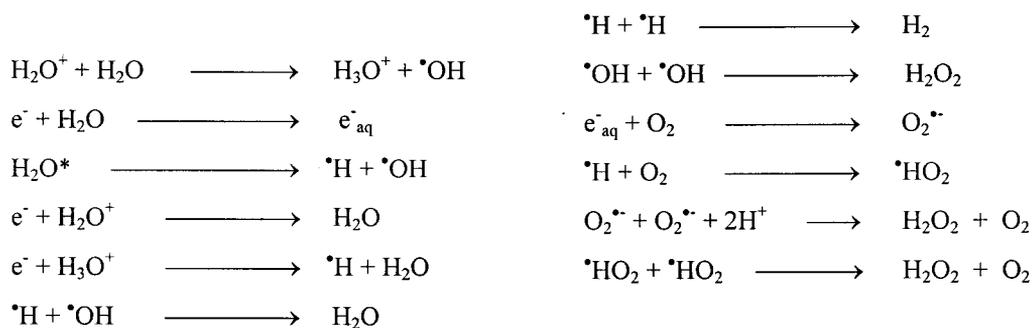
De todas las biomoléculas que pueden ser dañadas por la radiación ionizante, la más importante es el ADN, ya que es portadora de la información genética y dirige la actividad celular. Las alteraciones producidas dependen de la dosis de radiación, la cual está relacionada con la transferencia lineal de energía (LET), que se define como la energía depositada por una partícula por distancia recorrida ($\text{KeV}/\mu\text{m}$). Los rayos X y γ son radiaciones de baja LET (entre 3-3,5 $\text{KeV}/\mu\text{m}$ o incluso menores) por lo que depositan poca cantidad de energía a lo largo de su trayectoria, pero con suficiente energía cinética como para atravesar grandes distancias en los tejidos (alto poder de penetración). Por el contrario, las radiaciones de alta LET, como neutrones, protones y partículas α , emitidas en la desintegración radiactiva de ciertos radioisótopos, depositan grandes cantidades de energía en su trayectoria y atraviesan distancias más cortas (comprende de 10 a cientos de $\text{KeV}/\mu\text{m}$). La efectividad de una dosis dada aumenta con la densidad de la ionización, es decir, con la LET. La LET es un parámetro importante en la determinación de la curva dosis-respuesta, en la eficiencia biológica relativa (RBE) de los diferentes tipos de radiación y en la distribución del daño cromosómico en las células.

1.1.1 Efectos biológicos de la radiación ionizante

La exposición de las células a la radiación ionizante provoca distintos fenómenos como consecuencia del daño en el ADN, de los cuales los más importantes son la inducción de mutaciones, la transformación y la muerte celular (Iliakis, 1991).

El daño en el ADN puede ser el resultado directo de la interacción de la radiación sobre los componentes del ADN, o bien ser producido indirectamente por la transferencia de energía a través de especies reactivas formadas por la radiación. El agua es el principal constituyente de los sistemas biológicos (aproximadamente un 90%) por lo que el efecto indirecto resulta, en gran parte, de la acción de la radiación sobre las moléculas de agua (Kiefer, 1990).

Cuando una molécula de agua absorbe la energía de la radiación ionizante se ioniza o se excita descomponiéndose rápidamente (figura 2). También se dan reacciones secundarias en las que se originan nuevos radicales libres y en las que se neutralizan otros. Los electrones liberados en la ionización del agua pueden reaccionar con otras moléculas de agua formándose electrones hidratados (e^-_{aq}), los cuales a su vez pueden reaccionar para dar lugar a nuevos radicales. Entre los principales productos formados se encuentran los radicales hidrógeno ($\cdot H$) e hidroxilo ($\cdot OH$), ambos con electrones desapareados y altamente reactivos. Cuando el oxígeno está presente reacciona con los electrones acuosos y los átomos de hidrógeno originando radicales superóxido ($O_2\cdot^-$) e hidroperóxido ($\cdot HO_2$), que son también muy inestables y reaccionan formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual, aunque no es un radical libre, es una molécula altamente reactiva y peligrosa para la célula.

Reacciones primarias*Reacciones secundarias***Figura 2.** Radiolisis del agua.

Así, la descomposición del H_2O_2 incrementa la producción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que reaccionan también con especies no radicales, siendo los principales responsables del daño en el ADN. El radical hidroxilo es uno de los más reactivos en los sistemas biológicos, y es capaz de reaccionar prácticamente con la totalidad de los componentes celulares (Davies, 1995). Como consecuencia, el ADN puede sufrir pérdida de bases (sitios abásicos), modificación de las mismas o alteraciones en la doble hélice. Las alteraciones en la doble hélice incluyen distorsiones de la misma, roturas de cadena (simple y doble) y enlaces cruzados (Halliwell y Aruoma, 1991). Se ha estimado que aproximadamente un 65% del daño se debe al ataque de los radicales hidroxilo frente a un 35% producido por la acción directa de la radiación (Ward, 1988).

1.1.2 Lesiones producidas por la radiación ionizante

La exposición a radiación ionizante da lugar a la formación de distintas lesiones en el ADN (figura 1), como son daño en los azúcares (que normalmente terminan en roturas de cadena), daño en las bases y formación de enlaces cruzados (intracatenarios, intercatenarios o con proteínas asociadas). Además, la radiación ionizante produce directamente roturas de

cadena (simple y doble), la mayoría de las cuales se generan por la rotura de los enlaces fosfodiéster.

Las lesiones producidas por la radiación pueden originarse de forma aislada, o junto a otras lesiones del mismo o distinto tipo, dando lugar en este caso a lesiones complejas. Las lesiones complejas son causadas por un ataque radical múltiple localizado, que produce sitios con lesiones agrupadas (LMDS) tras, por ejemplo, una exposición a rayos X (Ward, 1988). Estas lesiones complejas representan para las células un problema más serio que las simples, ya que pueden ser irreparables o requerir mecanismos de reparación más complejos, como el de recombinación. Si estas lesiones no se reparan correctamente, pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas, deleciones, amplificaciones, etc.

De las lesiones producidas por la radiación ionizante, la rotura de doble cadena es la principal responsable de la inducción de aberraciones cromosómicas y puede conducir a la muerte celular (Frankenberg-Schwager y Frankenberg, 1990; Obe y col., 1992).

Las roturas de doble cadena se pueden producir por la inducción de una rotura simple en cada cadena, bien de forma directa, o bien por la inducción de lesiones en las bases si su reparación implica la formación de roturas de cadena simple. Una combinación de los procesos anteriores también da lugar a una rotura de doble cadena. Es por tanto, en último término, el efecto al que conducen la mayoría de las lesiones directas en el ADN.

El mecanismo de formación de roturas de cadena simple está bien establecido, y se inicia con la formación de un radical en la desoxirribosa por pérdida de un átomo de hidrógeno (ya sea por ionización directa y pérdida del protón, o extraído por un radical hidroxilo). Este radical reacciona con el oxígeno formando un radical peroxil y una rotura (von Sonntag, 1987).

Se han propuesto dos mecanismos posibles por los que se originaría una rotura de doble cadena: ataque de un solo radical y ataque múltiple. Siddiqi y Bothe (1987) propusieron que un solo radical puede iniciar la formación de una rotura de doble cadena. El primer radical desoxirribosa formado por el ataque del radical hidroxilo (o por la ionización directa del azúcar) iniciaría una serie de reacciones para formar la segunda rotura. Por otra parte, según la hipótesis del ataque radical múltiple, la rotura de doble cadena se produciría por el ataque simultáneo de varios radicales. En la célula, debido a la alta concentración de secuestradores, los radicales recorren distancias extraordinariamente cortas, de nanómetros, por lo que reaccionan muy cerca del sitio donde se forman, de manera que el daño se produciría por concentraciones de ionizaciones y excitaciones en el blanco o muy cerca del mismo (Ward, 1988). Para el mecanismo de un solo radical, las reacciones que forman las dos

roturas de cadena se darían secuencialmente, mientras que en el caso del ataque múltiple se darían simultáneamente.

La mayoría de las roturas inducidas por la radiación ionizante se caracterizan por presentar extremos inusuales. Aunque la mayoría de los extremos 5' presentan un grupo fosfato, los extremos 3' no suelen presentar el grupo hidroxilo usual, sino un grupo fosfato o fosfoglicolato (Henner y col., 1982).

1.2 MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN

La molécula de ADN es el componente bioquímicamente activo de casi todo el material genético, y, aunque el ADN es una molécula dinámica, su integridad debe ser mantenida para la supervivencia del ser humano. Dado que el medio ambiente está atacando constantemente a nuestro material genético provocando daño, los seres vivos han desarrollado a lo largo del proceso evolutivo toda una serie de mecanismos de defensa para poder sobrevivir y mantener la integridad de sus genes. Cualquier daño producido sobre el ADN celular es respondido de forma instantánea por una variedad de rutas bioquímicas cuyas funciones son reparar las lesiones en el ADN y minimizar las mutaciones. Además de los sistemas de reparación, las lesiones en el ADN son también reconocidas, directa o indirectamente, por los “checkpoints” o puntos de control que regulan el ciclo celular. Estos mecanismos inhibitorios detienen el ciclo celular en la fase G1, G2/M o M, alargan la fase S (síntesis de ADN), y en algunos casos también activan o regulan los procesos de reparación del ADN. Así, la reparación del ADN junto con los mecanismos de regulación/ control del ciclo celular que detectan el daño en el ADN constituyen el principal sistema de defensa para el mantenimiento de la integridad genómica cuando existen acontecimientos de daño en el ADN (Li y col., 2001).

1.2.1 Respuesta molecular inicial al daño por radiación ionizante

Existe un grupo de proteínas sensoras del daño, encargadas de detectar lesiones en el ADN y producir una señal inicial de “checkpoint”. A partir de este momento se activa una cascada de fosforilación de proteínas para la transducción de la señal. Éstas proteínas reciben y procesan la señal inicial de “checkpoint” activando la parte efectora de la ruta, la cual directamente hace blanco sobre componentes de la maquinaria del ciclo celular (Zhou y Elledge, 2000) (figura 3).

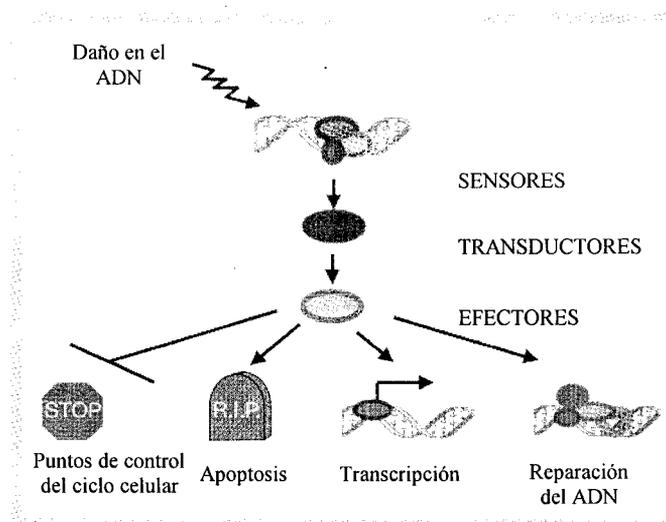


Figura 3. Cascada de transducción de la señal de respuesta al daño en el ADN.

Se piensa que la detención de la progresión del ciclo celular da a la célula tiempo suficiente para reparar el ADN dañado. Lo más importante es sin duda que este hecho previene que las lesiones se conviertan en mutaciones heredables a través de la síntesis del ADN y de la división celular.

Su importancia se pone de manifiesto de manera clara por la existencia de enfermedades hereditarias asociadas con defectos en la activación de los puntos de control del ciclo celular (checkpoints), tales como ataxia telangiectasia y el síndrome de fragilidad cromosómica de Nijmegen (Meyn, 1995; Shiloh, 1997). Estos trastornos causan hipersensibilidad a los agentes que provocan daño al ADN e inestabilidad cromosómica espontánea.

La quinasa ATM (defectiva en ataxia telangiectasia), perteneciente a la superfamilia de la PI-3 quinasa (Savitsky y col., 1995), es un componente central de la ruta de control para el reconocimiento de determinados tipos de daño en el ADN, particularmente las DSBs producidas por radiación ionizante. Ante la exposición a radiación ionizante, la actividad quinasa de la proteína ATM se activa inmediatamente (Canman y col., 1998), resultando en la fosforilación de un número de blancos críticos implicados en la reparación, la apoptosis, y la detención del ciclo celular (en la figura 4 se detallan algunas de las proteínas más importantes que participan en la transducción de la señal de respuesta al daño en el ADN) (revisado por Thompson y Schild, 2001).

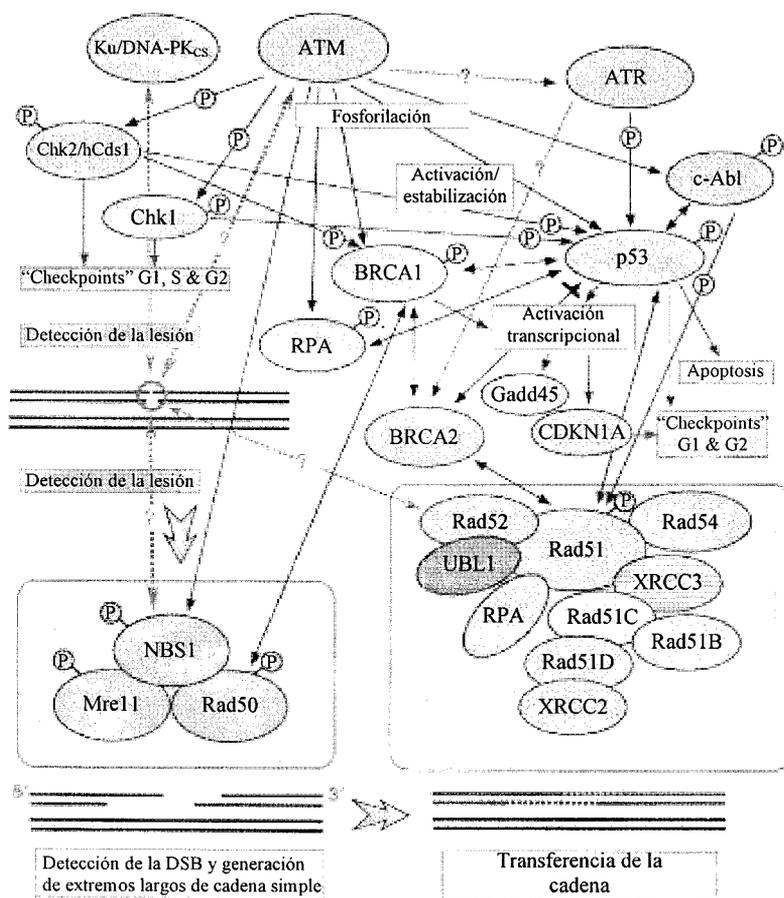


Figura 4. Principales proteínas implicadas en la transducción de la señal en respuesta al daño en el ADN.

1.2.2 Reparación del daño en el ADN

Las células están constantemente expuestas a agentes que causan distintas formas de daño al ADN y poseen métodos complejos y efectivos para reparar dicho daño. La reparación puede ser definida como la respuesta celular que tiene como objetivo el restablecimiento de la secuencia normal de nucleótidos (Wassermann, 1994), si bien en general se incluyen dentro del término todas las respuestas celulares que eliminan los efectos perjudiciales del daño en la célula, aunque no se recupere necesariamente la secuencia original de nucleótidos.

A medida que se desarrollaron organismos más complejos con genomas mayores y tiempos de generación más largos, se incrementó la efectividad de la reparación del ADN. Estos mecanismos están regulados por múltiples genes y existen diferentes rutas, dependiendo del tipo de daño inducido. La mayor parte del conocimiento sobre la reparación del ADN se ha obtenido en bacterias y levaduras, y más recientemente en roedores y humanos gracias sobretudo a la existencia de diferentes líneas mutantes deficientes en reparación.

Los principales mecanismos de reparación se han conservado a través de la evolución y actúan frente a un amplio espectro de agentes genotóxicos. Podrían resumirse en tres grandes grupos (figura 5): reparación por eliminación directa del daño, reparación por escisión y reparación por recombinación (Wassermann, 1994). Las roturas de doble cadena o de cadena simple forman parte del último paso en la mayoría de los mecanismos de reparación, por lo que existe un gran interés en conocer cómo se reparan estas lesiones.

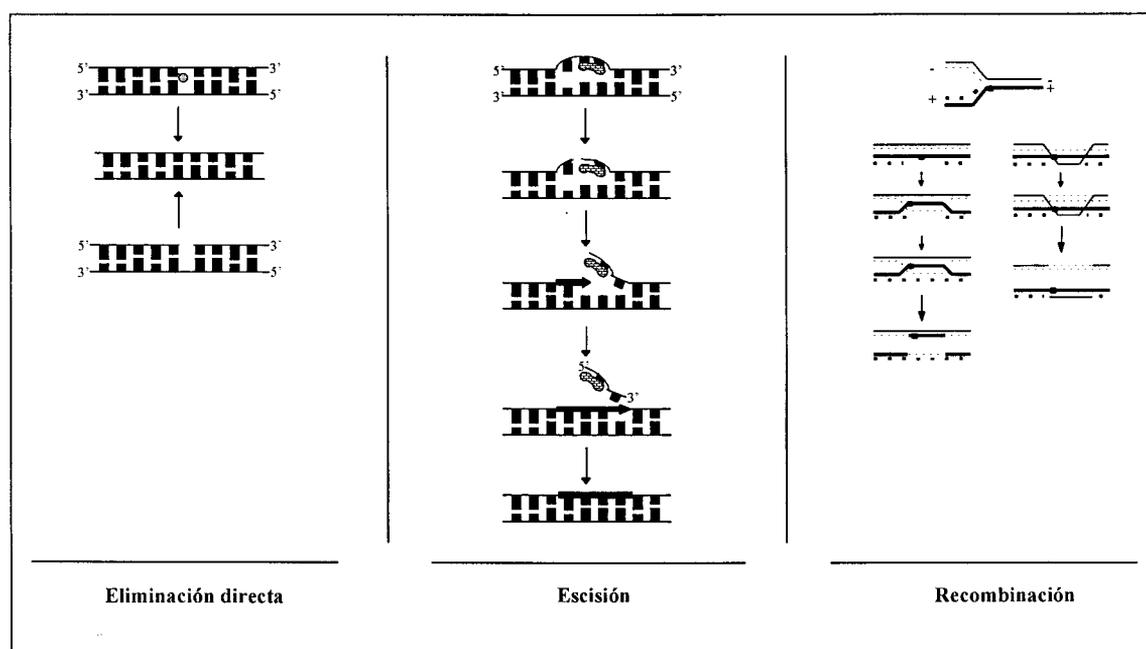


Figura 5. Mecanismos de reparación del ADN. Existen tres reacciones fundamentales implicadas en el procesamiento del daño en el ADN: eliminación directa del daño, escisión y recombinación.

1.2.2.1 Reparación de las roturas de cadena simple (SSB)

La radiación ionizante produce roturas de cadena simple, cuya reparación no es un proceso sencillo y puede tener lugar mediante los tres mecanismos ya descritos. De cualquier manera, las células son capaces de reparar en gran medida y con gran fiabilidad este tipo de lesión.

Las roturas de cadena simple que presentan extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato pueden ser reparadas por la simple reunión de ambos extremos catalizada por las ligasas de ADN. La ligasa de ADN es una enzima altamente específica, ampliamente distribuida, y tiene un papel muy importante en la mayoría de las rutas bioquímicas que requieren la reunión de roturas de cadena en el ADN (Lehman, 1974). Todas las ligasas necesitan extremos libres en la doble cadena de ADN y la presencia de extremos adyacentes 3'-hidroxilo y 5'-fosfato (Kornberg y Baker, 1992), de modo que solamente las roturas con estas características son susceptibles de ser reparadas directamente (figura 6).

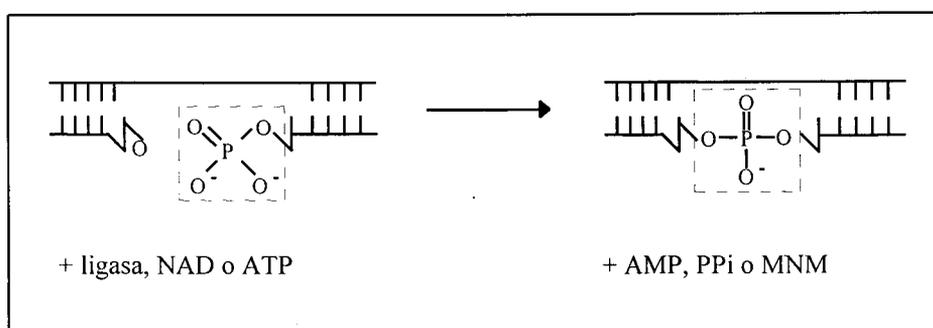


Figura 6. Reunión directa de una rotura de cadena simple. La ligasa cataliza la unión de roturas con extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato adyacentes. La enzima de *E. coli* requiere como cofactor NAD, mientras que la del fago T4 y las enzimas eucarióticas requieren ATP.

En muchos casos, y dependiendo del agente inductor del daño, estas lesiones no presentan la estructura correcta para la actuación de las ligasas, por lo que es necesaria la intervención de diferentes enzimas de reparación antes de la ligación.

1.2.2.2 Reparación de las roturas de doble cadena (DSB)

Las roturas de doble cadena son lesiones que pueden originarse espontáneamente durante los procesos celulares (Gellert, 1992), o como resultado de la exposición a agentes genotóxicos como la radiación ionizante, radicales oxidantes y drogas usadas en quimioterapia, como la bleomicina (Ward, 1988; Povirk y Austin, 1991).

Se ha demostrado en numerosos estudios que las roturas de doble cadena son lesiones que pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas, mutaciones y transformación celular, e incluso provocar la muerte celular si no se reparan correctamente (Natarajan y Obe, 1984; Bryant y Ritches, 1989; Miles y Meuth, 1989; Frankenberg-Schwager y Frankenberg, 1990; Jeggo, 1990; Iliakis, 1991). Los efectos nocivos de las DSB han llevado a los organismos a desarrollar múltiples rutas de reparación (Ivanov y Haber, 1997; Kanaar y Hoeijmakers, 1997).

Los mecanismos involucrados en la reparación de las DSBs pueden agruparse formalmente en dos grupos: mecanismos dependientes de homología (HRR= *homologous recombination repair*) o de recombinación homóloga y mecanismos independientes de homología (NHEJ= *non-homologous end joining*) o de recombinación ilegítima.

1.2.2.2.1 Reparación de las DSBs por recombinación homóloga (HRR)

Muchos de los conocimientos actuales sobre la HRR proceden de varias décadas de investigación básica en fagos, bacterias y levaduras, organismos en los que la HRR es muy

común y eficiente. Investigaciones llevadas a cabo en células de levaduras sensibles a la radiación o deficientes en recombinación meiótica han revelado la implicación del grupo epistático de genes *RAD 52* (*RAD50-RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* y *XRS2*) para la reparación de las DSB por recombinación homóloga (Petes y col., 1991; Game, 1993). La importancia de la ruta de reparación del ADN por recombinación del *RAD52* parece evidenciarse en base a su conservación en la evolución. Se han aislado genes de ratón y humanos con secuencias similares a *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54* y *MRE11* (Kanaar y Hoeijmakers, 1997; Petrini y col., 1997). La disponibilidad de los genes del grupo de *RAD 52* nos ha proporcionado las herramientas necesarias para los análisis bioquímicos de los mecanismos moleculares de la recombinación homóloga (Kanaar y col., 1998).

La secuencia de aminoácidos de rad51p de *S. cerevisiae* fueron determinantes en los primeros experimentos bioquímicos debido a su similitud con la proteína de recombinación RecA de *Escherichia coli* (Ivanov y Haber, 1997). Estos experimentos mostraban que reacciones clave en la recombinación homóloga (la búsqueda de la secuencia homóloga en el ADN y el intercambio de las cadenas) se llevaban a cabo por mecanismos extraordinariamente similares en bacterias, levaduras y en células humanas. RecA, Rad51p y la humana RAD51 polimerizan en el ADN para formar un filamento de nucleoproteína que lleva a cabo la búsqueda del ADN homólogo (Kowalczykowski y Eggleston, 1994). Esta búsqueda termina con la interacción de moléculas en las regiones homólogas en el ADN, seguida por el intercambio de las cadenas.

Durante cierto tiempo se ha considerado que en vertebrados la NHEJ es más eficiente que la HRR (Roth y Wilson, 1988). Sin embargo, recientemente se ha indicado que las células de mamífero son también eficientes en HRR (Thompson, 1996; Liang y col., 1998).

La HRR se caracteriza por requerir extensas regiones de homología (varios cientos de pb). El proceso de HRR puede ser conservativo o no conservativo. Los mecanismos de HRR conservativos (figura 7A) se caracterizan por la reparación precisa de la DSB, al restituir la secuencia original de la rotura copiando la información de la cromátida o cromosoma homólogo. Se han descrito tres mecanismos de reparación conservativa: DSBR= *double-strand break repair*; SDSA= *synthesis-dependent strand annealing* y BIR= *break-induced replication* (revisado por Pfeiffer y col., 2000 y Thompson y Schild, 2001)

DSBR: Modelo propuesto por Resnick (1976) y más tarde elaborado por Szostak y colaboradores (1983). El proceso se inicia con el aumento de la rotura en sentido 5'→3' generándose en el lugar de la DSB un hueco con extremos de cadena simple 3'. A continuación, uno de los extremos 3' invade el cromosoma homólogo o la cromátida hermana

a nivel de la región homóloga y se inicia la síntesis de reparación actuando el extremo 3' como cebador en este proceso de reparación semiconservativa. Una vez se ha rellenado el hueco se resuelve la estructura recombinante generándose productos con y sin entrecruzamiento.

SDSA: Similar al modelo DSBR con la diferencia que las nuevas cadenas sintetizadas son desplazadas de la molécula molde (molécula receptora) a la molécula rota (molécula donadora). Por lo tanto, en este caso la síntesis de reparación es conservativa (revisión por Pâques y Haber, 1999).

BIR: Este modelo se caracteriza porque solo uno de los extremos de la DSB invade al cromosoma homólogo o cromátida hermana. En este caso, la síntesis de reparación se realiza como si se tratara de una verdadera horquilla de replicación (Mosig, 1987; Kogoma, 1996; Chen y Kolodner, 1999).

En contraste, la HRR no conservativa (figura 7-B) implica inevitablemente pérdida de material (Lin y col., 1984). Se ha descrito solo el modelo SSA (*single-strand annealing*), el cual describe la reparación de DSB cuando ésta ocurre entre dos regiones homólogas. El proceso se inicia con el acortamiento de los extremos en sentido 5'→3' hasta que las regiones de homología flanqueantes de la rotura están expuestas en los extremos de cadena simple en 3', de forma que es posible la hibridación entre las regiones homólogas. Después de la hibridación entre las regiones homólogas, se eliminan los extremos sobrantes y el proceso se completa con los pasos de síntesis y ligación. Este proceso permite la reparación de la DSB, pero de nuevo con la pérdida de material (Carroll y col., 1986; Mayron y Carroll, 1991a,b).

Por otra parte están los mecanismos independientes de homología, NHEJ, los cuales son capaces de unir directamente extremos de DSB. La independencia de homología no quiere decir que la homología nunca esté implicada. De hecho, a menudo se requieren pequeñas regiones de homología de 1-10 pb.

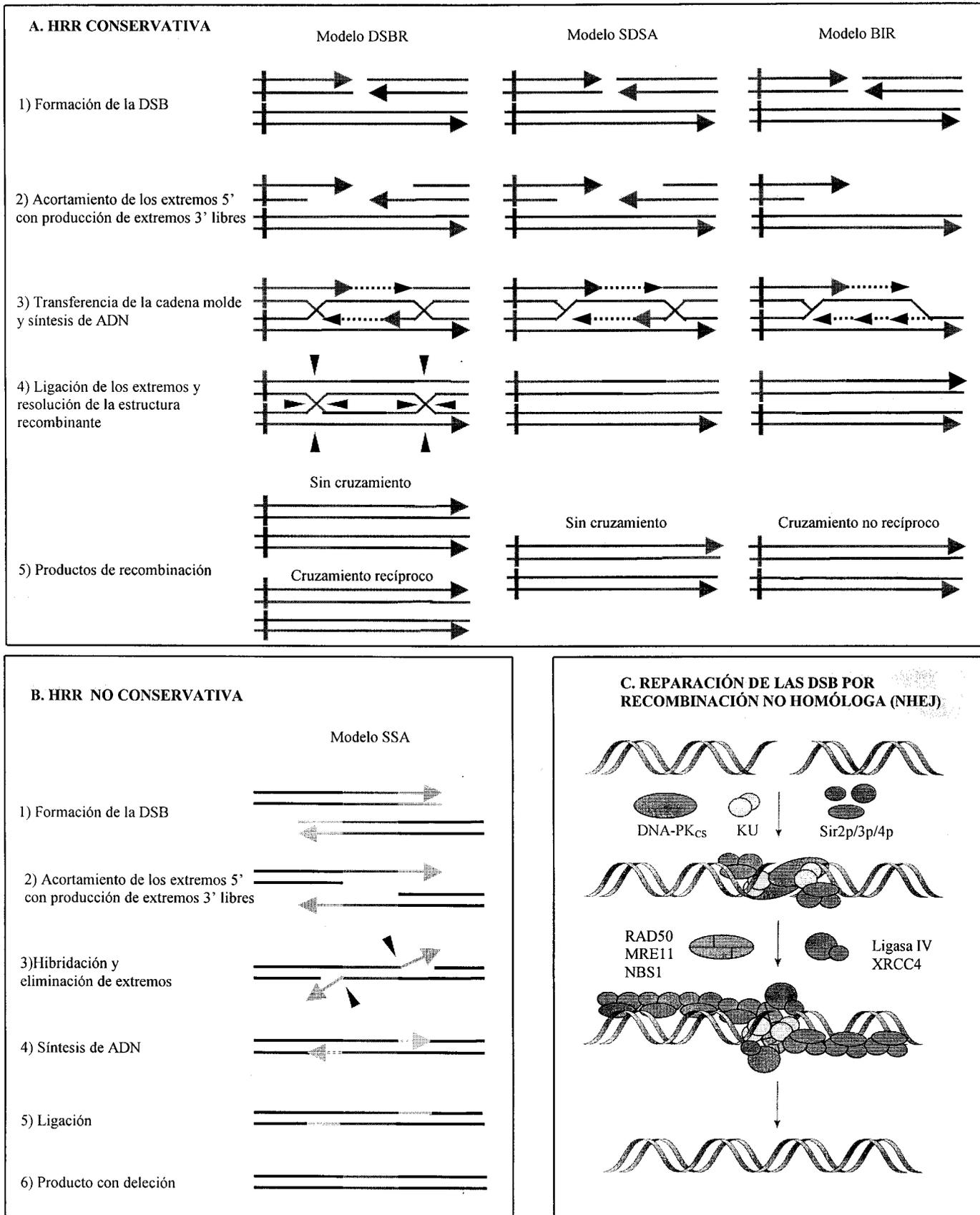


Figura 7. Mecanismos de reparación de las DSBs. (A) Reparación por recombinación homóloga conservativa (HRR CONSERVATIVA); (B) Reparación por recombinación homóloga no conservativa (HRR NO CONSERVATIVA); (C) Mecanismo de reparación por recombinación no homóloga o ilegítima (NHEJ).

1.2.2.2.2 Reparación de las DSBs por recombinación no-homóloga o ilegítima (NHEJ)

Este parece ser el mecanismo que opera más frecuentemente para reparar las DSBs en mamíferos. (revisado por Kanaar y col., 1998; Pfeiffer y col., 2000; Karran, 2000). El análisis de líneas celulares de hámster hipersensibles a la radiación ionizante y defectuosas en la reparación de las DSB y en la recombinación V(D)J ha conducido a la identificación de cuatro grupos de complementación implicados en la NHEJ (para revisiones ver Jeggo, 1990, 1998; Zdzienicka, 1999).

Los genes correspondientes (*XRCC4-XRCC7*) codifican la proteína XRCC4, un cofactor esencial de la ligasa IV, y los tres componentes de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) representada por las subunidades de 70 (*XRCC6*) y de 86 kDa (*XRCC5*) del heterodímero complejo de unión a los extremos de ADN (Ku70/80) y por la subunidad catalítica de la proteína quinasa (DNA-PK_{CS}, *XRCC7*) (Jackson y Jeggo, 1995; Lieber y col., 1997; revisado por Featherstone y Jackson, 1999).

Análisis bioquímicos de factores implicados en la reparación del ADN por recombinación no homóloga nos han proporcionado información adicional sobre los mecanismos que operan en esta ruta de reparación (Jeggo, 1997). El heterodímero Ku70/80 se une con alta afinidad a los extremos del ADN, sugiriendo un papel temprano en el reconocimiento del daño, su procesado o en ambos. La unión de la Ku probablemente protege los extremos de la degradación nucleotídica (Liang y Jasin, 1996). Después de la unión al ADN, la Ku puede atraer a la subunidad catalítica (DNA-PK_{CS}), un polipéptido de 465 kDa con un dominio protein-kinasa C-terminal. Aunque la DNA-PK_{CS} posee actividad quinasa dependiente de ADN por sí misma, el heterodímero Ku unido al ADN incrementa enormemente esta actividad (Yaneva y col., 1997; Hammarsten y Chu, 1998).

Se sabe que la DNA-PK fosforila a diversas proteínas *in vitro*, pero su papel *in vivo* no está claro (Anderson y Carter, 1996). Una actividad interesante de la DNA-PK es la autofosforilación de la subunidad catalítica, la cual resulta en la inactivación de la actividad quinasa, probablemente causada por una afinidad reducida de la DNA-PK_{CS} fosforilada por el heterodímero Ku (Chan y Lees-Miller, 1996). Se ha ideado un modelo para la función temprana de la DNA-PK en la reparación de las DSB. Una vez unida la Ku a los extremos de ADN, ésta atrae a la subunidad catalítica. Posteriormente los extremos son aproximados, y la molécula DNA-PK en un extremo del ADN fosforila a la subunidad catalítica localizada en el otro extremo del ADN. Esta transfosforilación inactiva la actividad kinasa. Además la fosforilación podría resultar en una reorganización del complejo de proteínas en los extremos

para permitir así el acceso de otros factores de reparación a la rotura (Kanaar y col., 1998) (figura 7C).

Para las últimas etapas en el proceso de reparación se requiere el complejo con actividad nucleasa Rad50/Mre11/Xrs2 (en levaduras), que como vimos actuaba también en la reparación por recombinación homóloga. En células de mamíferos se han identificado homólogos de Rad50 y Mre11. La proteína Nbs1 es un homólogo funcional de la proteína Xrs2 de *S. cerevisiae*. El gen *NBS* está mutado en pacientes con el síndrome de Nijmegen.

Las proteínas humanas Rad50 y Mre11 forman un complejo inmunoprecipitable y colocalizan en discretos focos nucleares como consecuencia de la irradiación de células. La asociación de Nbs1 con el complejo hRad50/hMre11 tiene un efecto significativo en la actividad nucleasa del complejo, y además estimula la escisión endonucleolítica ATP-dependiente en las regiones en las que confluyen ADN de cadena simple o doble. Este complejo procesará los extremos para que finalmente actúe el complejo ligasa IV-XRCC4, que se encarga de sellar las cadenas (Karran, 2000).

Se sabe que la reparación por recombinación no-homóloga también existe en *S. cerevisiae* (Tsukamoto e Ikeda, 1998). Homólogos de Ku70, Ku80, XRCC4 y ligasa IV se han identificado en esta especie.

La estructura de la cromatina podría plantear un nivel adicional de complejidad en este proceso de reparación. Se ha visto que la delección de los genes *SIR2*, *SIR3*, o *SIR4* en *S. cerevisiae*, que se requieren para el mantenimiento de una estructura específica de la cromatina, provoca inhibición de la reunión de DSB (Tsukamoto y col., 1997; Boulton y Jackson, 1998). Se ha identificado un homólogo humano del gen *SIR2*, indicando que funciones similares para la estructura de la cromatina podrían existir también en células de mamíferos (Tsukamoto e Ikeda, 1998).

Los diferentes mecanismos de reparación de las DSBs en el ADN operan durante distintas fases del ciclo celular (Hendrickson, 1997). La HRR actúa predominantemente en regiones del ADN ya replicadas y en la fase G₂, mientras que la NHEJ actúa principalmente durante la fase G₁ y en cualquier caso antes de la replicación del ADN. Los mecanismos de reparación descritos, tanto los dependientes como los independientes de homología, tienen potencial para inducir ACs de tipo intercambio y pueden explicar el origen de las ACs de tipo cromosómico o cromatídico, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se ha inducido la DSB. Así, la HRR conservativa puede inducir ACs de tipo intercambio si la invasión al dúplex de ADN, en lugar de producirse a nivel de la secuencia homóloga en la cromátida hermana o cromosoma homólogo, se produce a nivel de una región repetida en otro

cromosoma (Lehrman y col., 1985; Vnencak-Jones y col., 1988). Igualmente, la reparación por SSA y NHEJ puede inducir ACs de tipo intercambio. En este caso se requiere la presencia de dos DSBs (cuatro extremos) para poder producirse la interacción entre extremos procedentes de diferentes DSBs y no entre los extremos de la misma DSB (Haber y Leung, 1996; Thacker, 1999). Por otra parte, las deleciones (fragmentos acéntricos) pueden originarse por DSB no reparadas o reparadas de forma incompleta (en la figura 24 se observan algunas de las aberraciones más frecuentes encontradas en este trabajo).

1.3 LÍNEAS CELULARES RADIOSENSIBLES DE MAMÍFEROS

Las líneas mutantes de roedores son de particular importancia para el análisis de la compleja relación existente entre daño en el ADN y respuestas celulares resultantes, tales como toxicidad, mutagénesis e inestabilidad cromosómica, además de ser muy importantes para la clonación, ya que son fáciles de cultivar, y a diferencia de las líneas celulares humanas transformadas, ellas son buenas receptoras de ADN exógeno transfectado. Debido al éxito de la utilización de células mutantes de hámster en la clonación de varios genes humanos implicados en los mecanismos de reparación por escisión (revisión por Weeda y Hoeijmakers, 1993), se aislaron varias líneas celulares de roedores sensibles a rayos-X (revisión por Collins, 1993; Zdzienicka, 1995). En la tabla 1 se describen las características principales de algunas de estas líneas mutantes y en la tabla 2 se puede observar la sensibilidad que presentan algunas de estas células a diferentes agentes que dañan el ADN. Hasta ahora se han identificado al menos 11 grupos de complementación, indicando de manera incuestionable la gran complejidad de las respuestas celulares a la radiación ionizante (Friedberg y col., 1995). Entre ellos, mutantes de tres grupos de complementación muestran un pronunciado defecto en la reparación de las DSB (Kemp y col., 1984; Jeggo y col., 1991; Thacker y Wilkinson, 1991). Mutantes de estos tres grupos (cuyas líneas celulares representativas son XR-1, xrs1 a xrs7 [*XRCC5*], y V3) están entre las líneas celulares mutantes de roedores más sensibles a los rayos X. Otros grupos (tales como EM9 [*XRCC1*] e irs1 SF [*XRCC3*]) se caracterizan por un defecto moderado en la reparación de las roturas de cadena simple y de doble cadena (Thompson y col., 1982; Fuller, y col., 1988; Thompson y col., 1990), mientras que mutantes en otro grupo presentan una tasa de reparación de roturas de cadena simple y de doble cadena un tanto reducida (BLM2) (Robson y col., 1989). Por otra parte, mutantes derivados de la línea celular de hámster Chino V79, como irs1, irs2 e irs3 son normales en cuanto a lo que se refiere a reparación de roturas de cadena simple y/o de doble cadena (Jones y col., 1988; Zdzienicka y col., 1989; Jones y col., 1990), pero al menos una de éstas (irs1 [*XRCC2*])

muestra reducida fidelidad de reunión de roturas de doble cadena en ensayos de reconstitución de plásmidos (Debenham y col., 1988). Los mutantes del grupo *irs2* (XRCC8) se caracterizan por presentar una síntesis radioresistente de ADN comparable con las células humanas AT (Zdzienicka y col., 1989).

Mutante	Líneas parentales	Características	Localización cromosómica	Gen
EM9 EM-C11	CHO(AA8) CHO9	reparación defectuosa de ssb sensibilidad a ag. Alquilantes alto nivel basal de SCE	19q13.2-13.3	<i>XRCC1</i>
<i>irs1</i>	V79	hipersensibilidad a MMC reunión propensa a error	7q36.1	<i>XRCC2</i>
<i>irs1SF</i>	CHO(AA8)	reparación defectuosa de ssb hipersensibilidad a MMC	14q32.3	<i>XRCC3</i>
XR-1 M10	CHOK1 L5178Y	reparación defectuosa de dsb recombinación defectuosa V(D)J	5q13-14	<i>XRCC4</i>
<i>xrs5</i> , 6 XR-V15B XR-V9B <i>sxi-2</i> , 3	CHOK1 V79B V79B V79-4	reparación defectuosa de dsb recombinación defectuosa V(D)J	2q35	<i>XRCC5</i> (Ku80)
<i>sxi-1</i>	V79-4	reparación defectuosa de dsb recombinación defectuosa V(D)J	22q13	<i>XRCC6</i> (Ku70)
V-3 <i>scid</i> <i>irs-20</i>	AA8 C.B.-17 CHO	reparación defectuosa de dsb recombinación defectuosa V(D)J	8q11	<i>XRCC7</i> <i>SCID / DNA-PKcs</i>
V-C4 V-E5 V-G8 <i>irs2</i>	V79 V79	reparación correcta de ssb y dsb Inestabilidad cromosómica síntesis de ADN radio-resistente defectos similares a AT	9	<i>XRCC8</i> A-T/NBS?
<i>irs3</i>	V79	reparación correcta de ssb y dsb síntesis de ADN radio-sensible		?
BLM2	CHOK1	reunión lenta de ssb y dsb escasa sensibilidad a los rayos-X		?
V-C8	V79	inestabilidad cromosómica síntesis de ADN radioresistente reunión lenta de dsb sensibilidad a diferentes mutágenos		?

Tabla1. Líneas celulares mutantes de roedores sensibles a radiación ionizante y características principales.

Mutante	Rayos-X	Bleomicina	EMS	MMS	MNNG	UV
<i>xrs-1</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-2</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-3</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-4</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-5</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-6</i>	■	■	■	■	■	■
<i>xrs-7</i>	■	■	■	■	■	■
EM9	■	■	■	■	■	■
<i>irs-2</i>	■	■	■	■	■	■

Tabla 2. Representación gráfica de la sensibilidad a distintos agentes que presentan algunas líneas celulares mutantes de mamíferos. (■) Sensibilidad marcada; (▨) débil sensibilidad; (-----) ninguna sensibilidad; los espacios en blanco corresponden a agentes no testados.

Para la realización de este trabajo de investigación hemos utilizado las líneas de roedores mutantes radiosensibles EM9, *xrs5* e *irs2* y sus correspondientes líneas parentales AA8, CHO K1 y V79, respectivamente.

La línea celular EM9 se aisló en base a su sensibilidad al EMS; adicionalmente mostraba sensibilidad a la muerte por rayos-X (Thompson y col., 1980; Thompson y col., 1982). Su grupo de complementación de la reparación del ADN fue designado XRCC1 (Thompson y col., 1990). Otras características de las células EM9 incluyen una elevada tasa espontánea de intercambios entre cromátidas hermanas y una deficiencia en la reparación de las SSB y de las DSB del ADN (Thompson y col., 1982). La deficiencia en la reparación del ADN de la línea EM9 se ha demostrado que se debe a una deficiencia en la proteína XRCC1 que interacciona con la ligasa III, lo cual causa una deficiencia en la actividad ligasa III de ADN (Lindahl y col., 1993; Caldecott y col., 1994 y 1995; Barrows y col., 1998).

La línea celular *xrs5* se aisló de la línea parental CHO K1 también tras el tratamiento con EMS (Jeggo y Kemp, 1983). Esta línea celular se seleccionó en base a su sensibilidad a la muerte celular inducida por rayos-X. Estas células son también defectuosas en cuanto a reunir las DSBs y son más sensibles que la línea parental CHO K1 a un número de otros agentes que

dañan el ADN (Jeggo y Kemp, 1983, Kemp y col., 1984). En particular, la línea *xrs-5* exhibe una marcada sensibilidad a los rayos-X, bleomicina, UV, MMS, EMS y cisplatino (Jeggo y Kemp, 1983, Schwartz y col., 1988). Con respecto a los rayos-X, Jeggo y Kemp (1983) han publicado que esta línea tiene una D_0 de 0.42 Gy, estas células son por tanto más sensibles que las células de la línea parental CHO K1, las cuales tienen un valor D_0 de 2.34 Gy. Jeggo y Holliday (1986) también han demostrado que la línea radiosensible *xrs* revertía con una alta frecuencia a línea resistente a los rayos-X después del tratamiento con 5-azacitidina, la cual es un agente demetilante y un mutágeno débil. Sus resultados sugieren que la hipermetilación en una secuencia específica del ADN resulta en radiosensibilidad. Estos resultados, junto con otros obtenidos por Jeggo demuestran la existencia de un único grupo de complementación para la línea mutante *xrs-5* (Jeggo, 1985), implicando un único gen responsable de la radiosensibilidad de la línea *xrs-5*. Su grupo de complementación es el XRCC5, y es interesante señalar, como vimos anteriormente, que el gen *XRCC5*, precursor de la proteína Ku80, interviene en la reparación por recombinación homóloga de las DSBs.

La línea mutante *irs2*, a pesar de mostrar radiosensibilidad, no presenta ningún defecto en la reparación del daño en el ADN. La frecuencia de las DSB inducidas en *irs2* es similar a las inducidas en la línea parental V79 (Jones y col., 1990; Thacker y Ganesh, 1990) y de forma similar la cinética y la fidelidad de reparación de las DSB en las dos líneas parece ser la misma en los intervalos de tiempo testados, por lo tanto esto no explicaría la hipersensibilidad de la línea *irs2* a la radiación ionizante (Bryant y col., 1993).

XRCC8 está representado por cuatro líneas mutantes de hámster Chino [*irs2* (Jones y col., 1987); V-C4, V-E5 y V-G8 (Zdzienicka y Simons, 1987)]. El fenotipo de los mutantes del grupo *XRCC8* muestran características similares a aquellas células humanas propensas a cáncer del síndrome de ataxia telangiectasia (AT) (Meyn, 1999). Los mutantes del grupo de complementación *XRCC8* y las células de AT muestran hipersensibilidad a la radiación ionizante y al inhibidor de Topo I CPT (Johnson y col., 2000), no presentan una incapacidad aparente para reunir roturas tanto de cadena simple como de doble cadena en el ADN y presentan una recombinación V(D)J normal (Smith y col., 1989; Zdzienicka y col., 1989; Jones y col., 1990; Thacker y Ganes, 1990). El gen *ATM* codifica una proteína de 350 KDa la cual presenta homología al dominio C-terminal de la familia de proteínas PI-3-K (Savitsky y col., 1995; Meyn, 1999). Otras proteínas que comparten esa homología con las PI-3-K en su dominio C-terminal (como la DNA-PK_{CS}) están implicadas en el control del ciclo celular o en la respuesta al daño en el ADN (Hoekstra, 1997). El gen *XRCC8* podría ser, en base a ello un nuevo miembro de la familia de proteínas PI-3-K, como ATM.

Además de estas líneas mutantes de hámster, el ratón *scid* (severe combined immunodeficiency) descrito por Bosma y colaboradores (1983) ha servido como un paradigma para entender la naturaleza del solapamiento existente entre la recombinación V(D)J y la reparación de las DSB. La recombinación V(D)J ocurre en mamíferos para la producción de linfocitos B y T. El hallazgo de que las células *scid* fueran sensibles a la radiación ionizante (Fulop, 1990) debido a su incapacidad para reparar las DSB inducidas por radiación ionizante o agentes radiomiméticos como la bleomicina (Biedermann y col., 1991; Hendrickson y col., 1991) indicaba una conexión entre la recombinación V(D)J y la reparación de las DSB inducidas por R.I. Este descubrimiento condujo de manera inmediata al reconocimiento del papel central de la DNA-PK en ambos procesos.

En los últimos 20 años se ha propuesto que las Topoisomerasas de ADN, enzimas nucleares altamente conservadas y muy importantes para el funcionamiento normal de la célula, podrían estar implicadas de alguna forma, todavía desconocida, en la reparación del daño en el ADN producido principalmente por radiación ionizante o por agentes químicos.

Nosotros nos hemos centrado principalmente en la reparación del daño por radiación ionizante (concretamente por rayos X). Por ello, mientras que en esta primera parte de la Introducción hemos estudiado el efecto de la radiación ionizante sobre la célula y los mecanismos celulares de repuesta al daño en el ADN, a partir de este momento vamos a centrarnos en una descripción de las Topoisomerasas, principalmente de mamíferos, para así poder discutir posteriormente nuestros resultados en base a la hipótesis propuesta.

TOPOISOMERASAS DE ADN

A diferencia del resto de las biomoléculas existentes en la naturaleza, el ADN es la única molécula que existe en forma de una doble cadena complementaria (Watson y Crick, 1953), salvo raras excepciones. Esta redundancia intrínseca permite la replicación, reparación y recombinación del material genético de forma que se asegure la fidelidad genómica, permitiendo además la diversidad entre los organismos vivos.

Las dos cadenas de la doble hélice están enrolladas de forma plectonémica (Watson y Crick, 1953; Boles y col., 1990). Aunque este importante atributo confiere una considerable estabilidad física al ADN, esto carga a la célula con problemas topológicos no imaginados previamente, tales como superenrollamiento y desenrollamiento, el anudado y el entrelazado

(Cozzarelli y Wang, 1990; Wang, 1996). Por ejemplo, la maquinaria de replicación del ADN debe ser capaz de poder hacer frente al intenso superenrollamiento de la doble hélice delante de una horquilla de replicación (Cozzarelli y Wang, 1990; Nitiss, 1994 y 1998; Wang, 1996; Peter y col., 1998). Además, los productos entrelazados resultantes de la replicación del ADN se deben separar el uno del otro para permitir posteriormente la segregación mitótica de las moléculas hijas (DiNardo y col., 1984; Cozzarelli y Wang, 1990; Wang, 1996; Nitiss, 1994 y 1998). Aunque estos problemas topológicos fueron originalmente reconocidos para moléculas circulares de bacterias y virus, hoy en día se aplican también a los largos cromosomas lineales de los eucariotas.

1.4 TOPOLOGÍA DEL ADN

El superenrollamiento del ADN se define como un giro o torsión del eje alrededor del cual se enrollan las dos cadenas del ADN, y es generalmente una manifestación de una tensión estructural. Se manifiesta en todos los ADN celulares y se encuentra estrictamente regulado en cada célula. Si no existe torsión o doblez del eje sobre sí mismo, se dice que el ADN se encuentra en su estado relajado.

Si las dos hebras del ADN están entrelazadas siguiendo una hélice dextrógira, al número de enlace se le asigna un valor positivo, mientras que si la hélice es levógira será negativo. Para una molécula de ADN circular cerrada en estado relajado, el número de enlace (LK_0) es el número de pares de bases de la molécula dividido por el número de pares de bases por vuelta de hélice (10.5) y se utiliza como referencia para cualquier otro estado de enrollamiento de esa misma molécula.

El ADN de células eucarióticas actúa topológicamente de forma similar a moléculas circulares de ADN de 2 cadenas cerradas covalentemente, ya que se encuentra eficazmente anclado a proteínas de la matriz nuclear organizado en forma de lazos o dominios topológicamente independientes. El estado topológico de un lazo de cromatina anclado a la matriz nuclear que no esté anudado o entrelazado también puede ser definido por el número de enlace.

1.5 TOPOISOMERASAS DE ADN

Durante procesos celulares vitales tales como replicación, transcripción, recombinación, reparación y reparto cromosómico en la división celular aparecen tensiones topológicas y enmarañamiento en el ADN que deben ser resueltas para preservar la integridad del material genético.

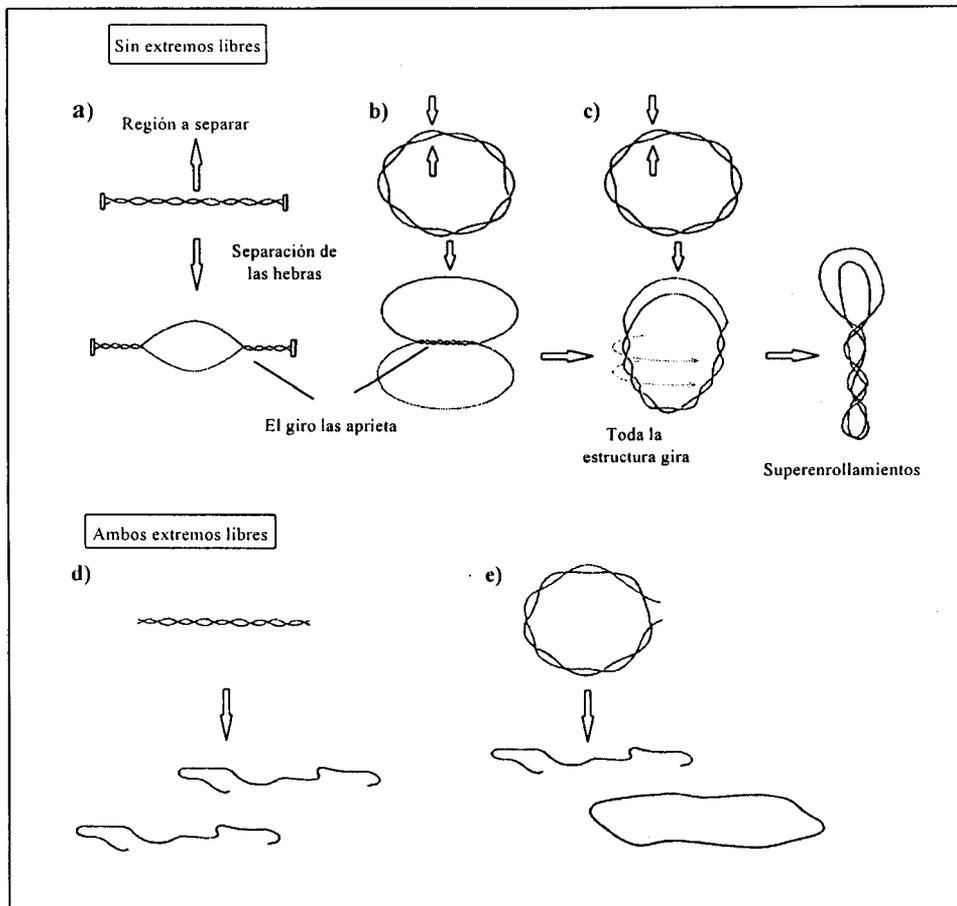


Figura 8. Superenrollamientos en moléculas de ADN sin o con extremos libres.

En una molécula de ADN de doble cadena sin extremos libres, para poder girar, como es el caso del ADN de las células eucarióticas, aumenta el nivel de tensión en una región de la molécula cuando en otra se separan las dos hebras de la molécula de ADN (figura 8a y 8b). Esta tensión se manifiesta como un superenrollamiento de la molécula (figura 8c). Si la molécula de ADN fuera lineal y con los extremos libres estos problemas no existirían (figura 8d); en el caso de una molécula de ADN circular de dos cadenas cerrada covalentemente, una rotura en una de las cadenas permitiría que el extremo libre girara alrededor de la otra hebra, impidiendo así un superenrollamiento si se separan las dos hebras (figura 8e).

Las Topoisomerasas de ADN (Topos) son las enzimas encargadas de regular el estado topológico de las moléculas de ADN mediante un proceso coordinado de rotura de la hebra de ADN, paso de otra hebra intacta a través de la rotura y ligación de la mella. Son una familia de enzimas, localizadas en el núcleo celular, altamente conservadas e indispensables para la viabilidad de todos los organismos tanto procariontes como eucariotas.

Las Topoisomerasas se dividen en dos grandes grupos basados en sus propiedades físicas y mecanismos de acción: las Topoisomerasas de ADN de tipo I, que rompen una hebra de la molécula de ADN y permiten el paso de otra hebra intacta a través de la rotura cambiando, por tanto, el número de enlace (LK) en múltiplos de la unidad, y las Topoisomerasas de ADN de tipo II, que rompen las dos cadenas de la molécula de ADN (segmento de ADN mellado) y permiten el paso de otra doble cadena de ADN intacto (segmento de ADN transportado) a través de la rotura cambiando el número de enlace en múltiplos de dos. Una vez liberada la tensión, las roturas se vuelven a sellar y se recupera un topoisómero de la molécula inicial sin alterar su secuencia nucleotídica (figura 9).

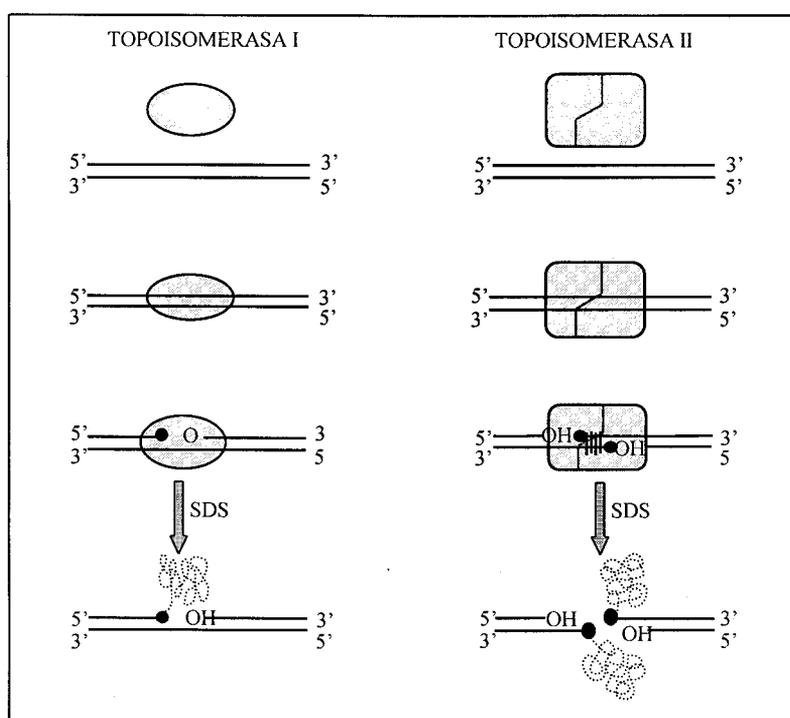


Figura 9. Mecanismo de acción de las Topoisomerasas de ADN.

En 1972, Champoux y Dulbecco encontraron por primera vez en extractos de *E. coli* una actividad enzimática capaz de relajar ADN superenrollado. Al principio se pensó que se trataba de una actividad endonucleasa y que la relajación del ADN ocurría por un ciclo de rotura del ADN mediante la endonucleasa y posterior sellado por una ligasa. Subsiguientes purificaciones de la enzima, sin embargo, demostraron que se trataba de una única enzima capaz de relajar ADN superenrollado. Esta enzima, designada originalmente como proteína ω , fue rebautizada posteriormente con el nombre de Topoisomerasa de ADN de tipo I de *E. coli*. Desde entonces se han descubierto Topoisomerasas de ADN en todas las células procariontas y

eucariotas estudiadas, e incluso algunos fagos y virus también son capaces de codificar sus propias Topoisomerasas.

La primera forma de Topo II aislada fue la girasa de procariotas. Esta enzima fue caracterizada y bautizada por Gellert con este nombre porque tenía la capacidad única de superenrollar moléculas de ADN, para lo cual necesita un aporte energético en forma de ATP (Gellert, 1981).

Las Topoisomerasas de tipo I se dividen en dos subfamilias, IA y IB (tabla 3), basándose en las diferencias que existen en sus mecanismos de acción (Lima y col., 1994; Redinbo y col., 1998). La subfamilia IA contiene a la girasa reversa de arqueas, a la Topo I y III bacterianas, y a la Topoisomerasa III α y III β eucarióticas. Estas enzimas se unen covalentemente al extremo 5' del extremo roto en el ADN mediante una unión fosfotirosina. Este mecanismo de acción las diferencia de la subfamilia IB, las cuales se unen al extremo 3' de la cadena de ADN (Han y col., 2001).

Topoisomerasas de ADN	Tipo	Structura	P.M. (kD)	Interacción ADN	Localización del gen (Cromosoma humano)
I	IB	Monomero	100	ssb	20 (20q 12-13.2)
III α	IA	2 isoformas (maduración alternativa)	110	ssb	17 (17p 11.2-12)
III β	IA	3 isoformas (maduración alternativa)	96	ssb	22 (22q 11-12)
II α	II	Homodimero	170	dsb	17 (17q 21-22)
II β	II	Homodimero	180	dsb	3 (3p 24)

Tabla 3. Clasificación de las Topoisomerasas de humanos

Se ha demostrado que la Topo III (perteneciente a la subfamilia IA) de eucariotas posee una débil actividad de relajación de superenrollamiento (Kim y Wang, 1992; Hanai y col., 1996; Seki y col., 1998; Hotoda y Hanai, 2000). Esto indica que la enzima necesita una región de cadena simple en el ADN para su interacción, característica común de las Topoisomerasas de tipo IA (Wang, 1996). Evidencias genéticas y bioquímicas muestran la existencia de una interacción entre la Topo III y las helicasas del tipo RecQ, lo que sugiere que, una vez que la helicasa ha separado las dos cadenas del dúplex, la Topo III se une al ADN de cadena simple a este nivel, con el fin de eliminar el superenrollamiento provocado por la helicasa como resultado de la separación de las hebras de ADN (Gangloff y col., 1994; Maftahi y col., 1999; Bennett y col., 2000; Wu y col., 2000; Shimamoto y col., 2000). Sin

embargo el mecanismo de acción que se sugiere para las dos enzimas no está completamente caracterizado.

Estudios con ratones “knock-out” han demostrado la importancia de la Topo III α ; ésta parece ser esencial para la proliferación celular ya que se ha observado que deleciones en el gen *TOP3 α* de ratón provocan letalidad embrionaria temprana (Li y Wang, 1998). Por otro lado, las deleciones en el gen de ratón *TOP3 β* no provocan letalidad, por lo que la enzima Topo III β no debe ser esencial para la proliferación, aunque la vida media del individuo se ve disminuída y está asociada a la aparición de múltiples defectos en los órganos (Kwan y Wang, 2001).

Análisis de los ARNm de la Topo III α y III β de eucariotas han demostrado que el transcrito primario, por maduración alternativa da lugar a dos isoformas, en el caso de la Topo III α , y a tres isoformas para la III β (Ng y col., 1999) (tabla 3) de distinta longitud, que comparten el dominio catalítico N-terminal y que además se conserva entre las Topoisomerasas de tipo IA (Hanai y col., 1996; Wang, 1996; Ng y col., 1999; Hotoda y Hanai, 2000). Ng y colaboradores sugieren, por otra parte, que una de las isoformas del hTOP3 β está además implicada en la resolución de problemas estructurales y en la segregación cromosómica.

1.5.1 Topoisomerasa I de mamíferos

La Topo I se ha conservado de forma parcial a través de la evolución desde levaduras hasta humanos (Kunze y col., 1991).

La Topo I de mamíferos es una proteína monomérica, perteneciente a la subfamilia IB (tabla 3), que existe en la célula como una fosfoproteína con un peso molecular de aproximadamente 100 KDa (Liu y Miller, 1981; Samuels y Shimizu, 1992; Cardellini y Durban, 1993). Esta enzima presenta un alto porcentaje de a.a. cargados, lo que explica la razón por la cual su actividad puede ser modulada por moléculas con carga (el ion Mg⁺⁺ y los policationes estimulan la actividad de la enzima mientras que los polianiones la inhiben) (Ishii y col., 1987).

El genoma humano contiene 3 loci que hibridan con sondas de ADNc derivadas de la Topo I. Dos de estos loci son pseudogenes, mientras que el tercer locus localizado en la región cromosómica 20q 12-13.2, contiene el gen funcional de la Topo I humana (Juan y col., 1988). Tanto la estructura exón/intrón (el gen tiene 21 exones distribuidos en al menos 85 Kb del genoma humano) como la secuencia de la región promotora de la Topoisomerasa I humana han sido determinadas, mostrando esta última características típicas de genes

expresados constitutivamente. En la figura 3 se muestran la estructura tridimensional de la proteína (figura 10A) y la organización en dominios del gen (figura 10B) para la Topo I humana.

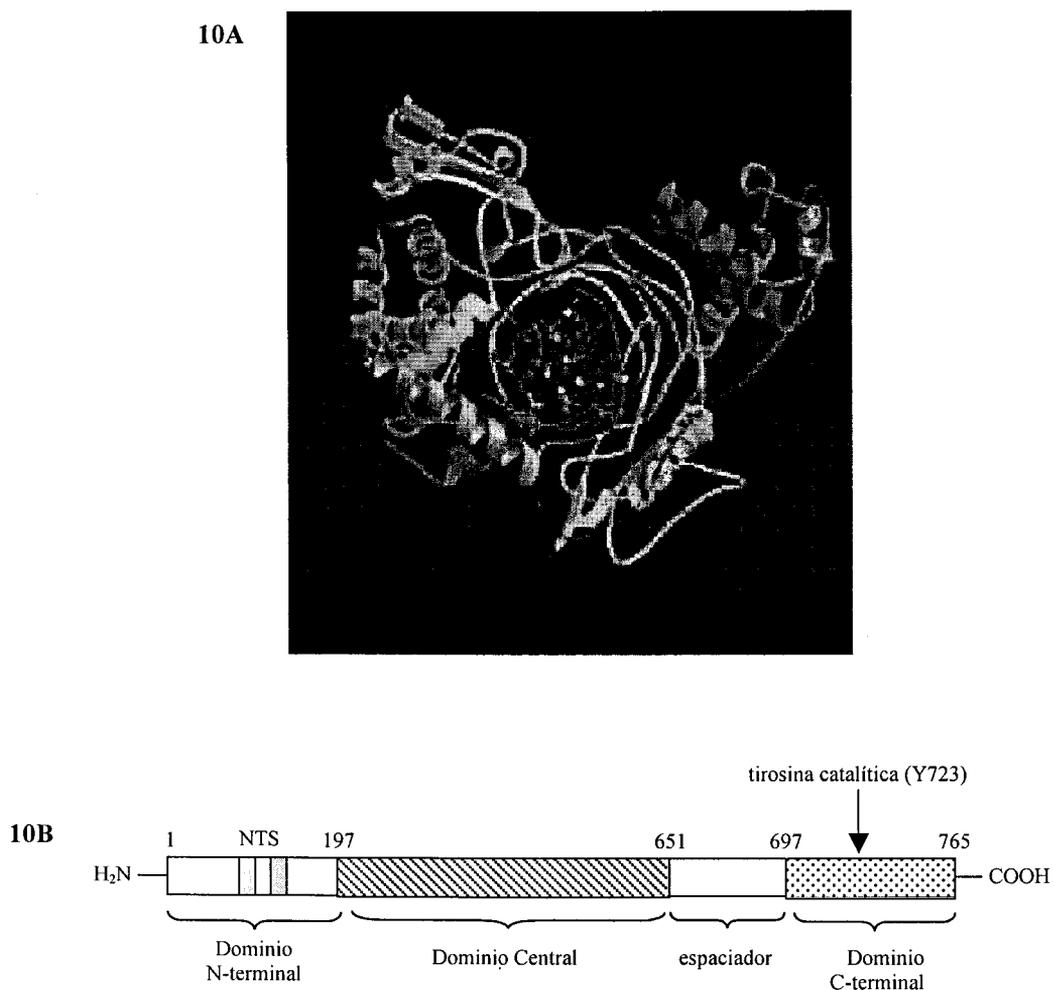


Figura 10. Estructura tridimensional (**10A**) y organización de los dominios de la Topo I humana (**10B**). NTS=*nuclear translocation sequence*

La Topo I parece estar implicada en transcripción, replicación y recombinación (Wang y col., 1990; Wang, 1991) en base a una serie de actividades que lleva a cabo dicha enzima. La Topo I es capaz de:

- * Relajar ADN superenrollado tanto positiva como negativamente, aunque tiene mucha más afinidad por moléculas de ADN superenrolladas negativamente. Esta afinidad va disminuyendo a medida que la molécula se va acercando a su estado relajado (figura 11A).

- * Anudar y desanudar moléculas circulares de ADN de una sola cadena (la formación de nudos depende de la presencia de regiones de apareamiento local de bases) (figura 11B).

* Formar moléculas de ADN circular de 2 cadenas a partir de 2 moléculas circulares de ADN de 1 cadena en las condiciones en que la molécula de 2 cadenas sea más estable. La transformación de una molécula de ADN circular de 1 cadena en un ADN lineal con una mella, seguida por la recircularización en presencia de otra molécula de ADN circular cerrada de una cadena, es seguramente responsable de la reacción de encadenamiento de la Topo I (McCoubrey y Champoux, 1986) (figura 11C).

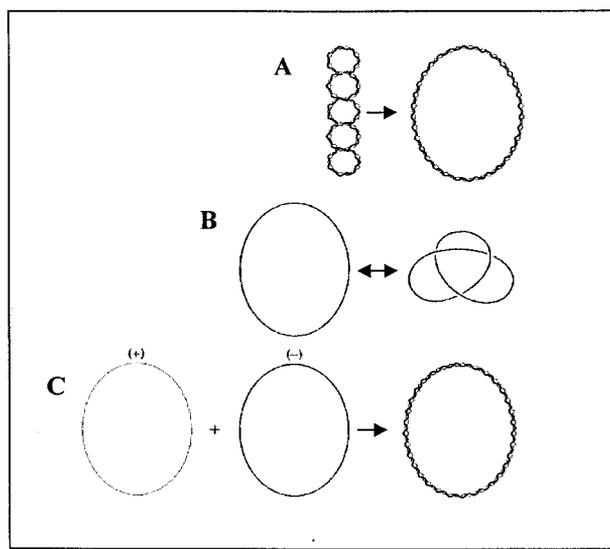


Figura 11. Reacciones de las Topoisomerasas tipo I de eucariotas.

1.5.2 Topoisomerasa II de mamíferos

La Topo II de eucariotas fue descubierta a finales de los años 80 y, aunque presenta algunas analogías con la girasa de procariontes, ambas enzimas difieren tanto a nivel estructural como funcional en algunos aspectos. La girasa es una proteína tetramérica A_2B_2 codificada por dos genes de *E. coli*, Gyr A y Gyr B, mientras que la Topo II de eucariotas es una proteína homodimérica. Además la Topo II de eucariotas purificada no actúa como una girasa y no tiene capacidad para superenrollar ADN relajado. El análisis de la secuencia de la Topo II de eucariotas sugiere que ésta evolucionó desde la Topoisomerasa II bacteriana por fusión de las dos subunidades girasa en una sola cadena polipeptídica (Tsai-Pflugfelder y col., 1988).

A diferencia de la Topo I, la Topo II es ATP-dependiente y está altamente conservada en todos los organismos vivos. Se han descrito en humanos y roedores dos isoenzimas de tipo II de peso molecular ligeramente diferente, 170 y 180 KDa respectivamente (tabla 3). En el genoma humano, el gen para la Topo II α (170KDa) está localizado en la región cromosómica

17q 21-22 (Tsai-Pflugfelder y col., 1988) y el gen para la Topo II β (180 KDa) está localizado en la región cromosómica 3p24 (Jenkins y col., 1992). En la figura 5 se muestra la estructura tridimensional, así como la organización de los dominios del gen para la Topo II α .

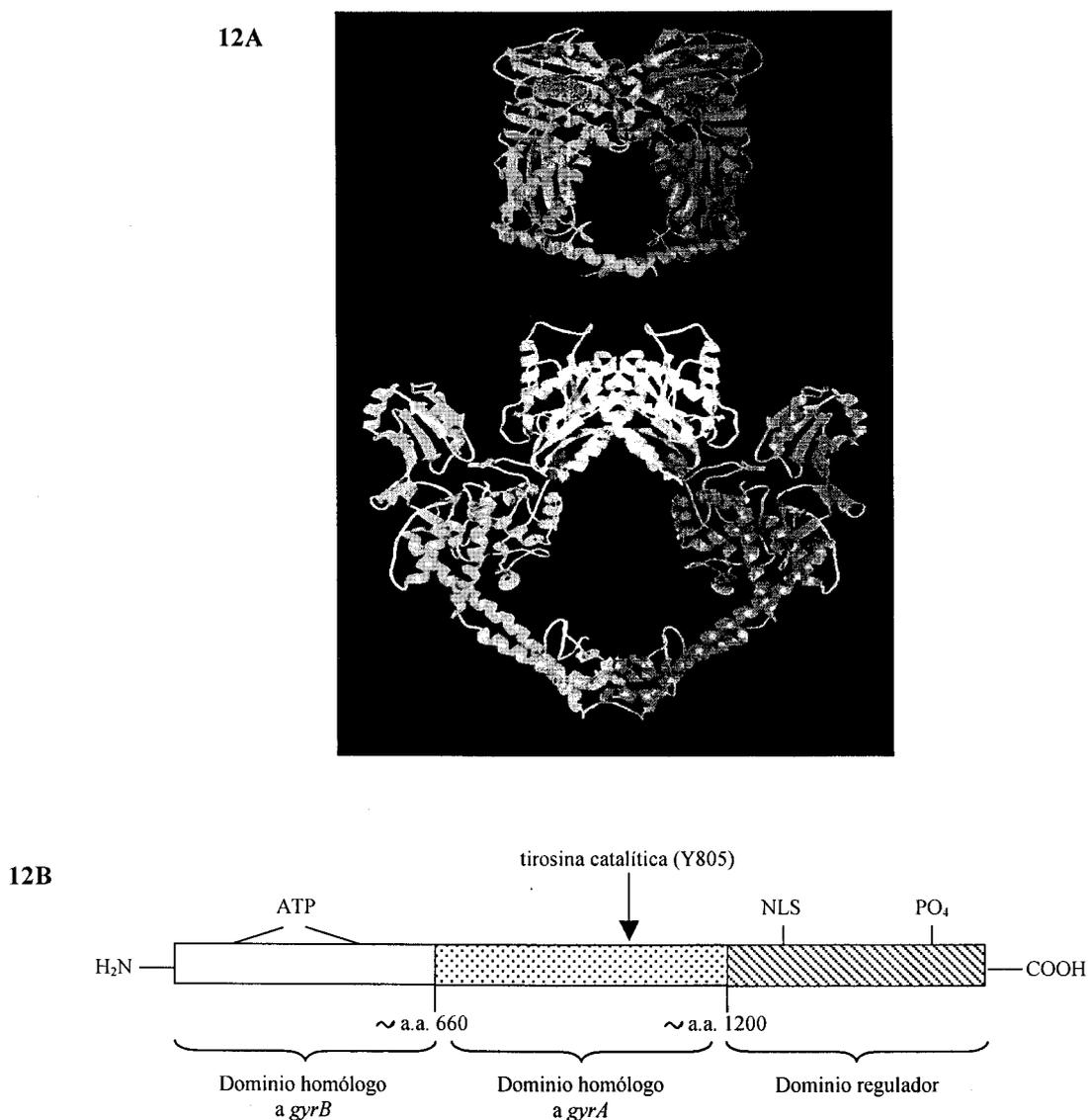


Figura 12. Estructura tridimensional (12A) y organización de los dominios de la topo II alfa humana (12B).

Existe una alta homología entre los genes de las isoenzimas Topo II α y Topo II β , pero son enzimas distintas, con funciones y regulación a lo largo del ciclo celular diferentes y, aunque el mecanismo catalítico de las isoenzimas es probablemente el mismo, experimentos preliminares indican que estas enzimas pueden ser distinguidas en base a sus propiedades bioquímicas y farmacológicas (Drake y col., 1987; 1989b). Con mucho, la mayoría de la

información referente a las Topoisomerasas de ADN de tipo II de mamíferos proviene de la Topo II α , a la cual nos referiremos de ahora en adelante como Topo II.

La Topo II es esencial para la supervivencia de las células eucariotas (Goto y Wang, 1984), ya que se requiere para la segregación de cromosomas mitóticos (DiNardo y col., 1984; Uemura y Yanagida, 1984; Holm y col., 1985; Uemura y col., 1987) y meióticos (DiNardo y col., 1984) y para el mantenimiento de la estructura cromosómica (Earnshaw y col., 1985; Earnshaw y Heck, 1985; Berrios y col., 1985; Gasser y col., 1986; Gasser y Laemmli, 1986). Además la Topo II está implicada probablemente en replicación, transcripción y recombinación (Wang, 1985; Bae y col., 1988; Dillehay y col., 1989; Osheroff, 1989a; Rose y col., 1990).

La Topo II es capaz de promover las siguientes reacciones (siempre en presencia de Mg²⁺ y ATP; figura 13):

- Si el segmento transportado y el segmento mellado de ADN residen en la misma molécula de ADN la Topo II puede:

** eliminar superenrollamiento de la molécula de ADN (figura 13A).

** añadir o eliminar nudos (figura 13B).

-Si el segmento transportado y el segmento mellado pertenecen a moléculas diferentes de ADN la Topo II puede:

**encadenar y desencadenar moléculas de ADN (figura 13C).

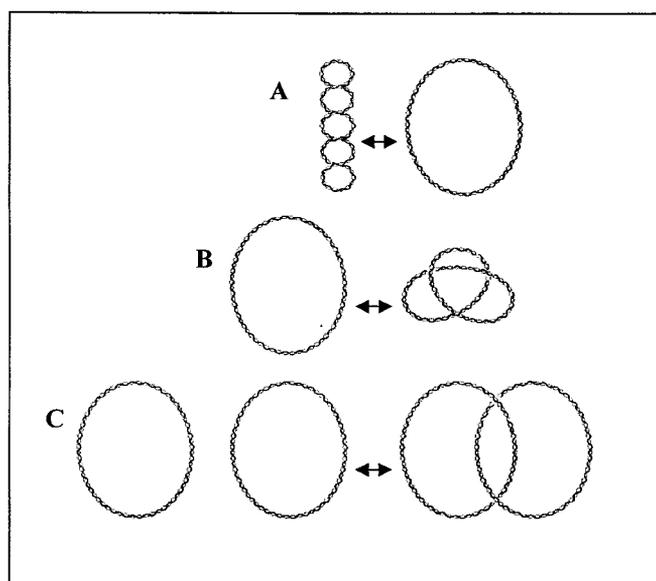


Figura 13. Reacciones de las Topoisomerasas tipo II de eucariotas

1.6 CICLO CATALÍTICO DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN DE MAMÍFEROS

La Topo I no requiere un cofactor energético para catalizar cambios topológicos en el ADN. La Topo II, sin embargo, requiere ATP y Mg^{2+} para completar su ciclo catalítico.

La reacción catalizada por las Topoisomerasas lleva consigo una serie de pasos que describimos a continuación (la figura 14 representa el ciclo catalítico de la Topo II).

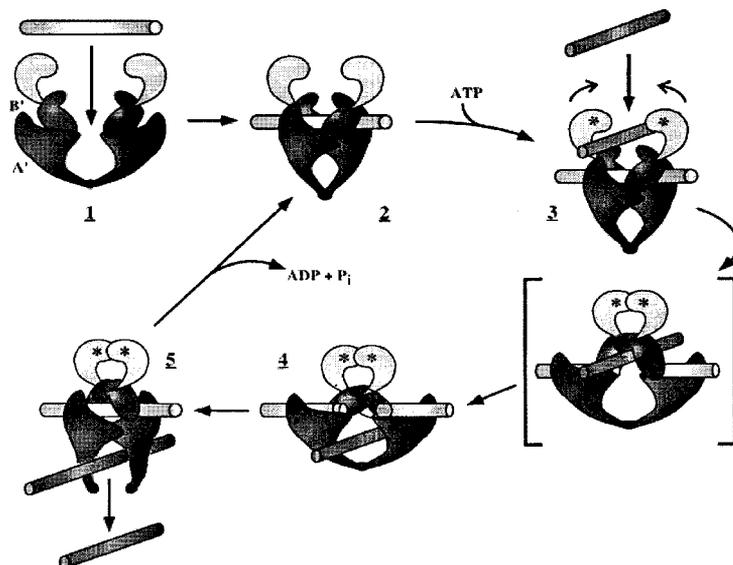


Figura 14. Ciclo catalítico de la Topoisomerasa de ADN de tipo II.

El ciclo de la enzima comienza con el reconocimiento del sustrato de ADN. Se establece una interacción no covalente entre la enzima y su sustrato y se forma el llamado “complejo de no rotura”. Esta interacción está determinada por dos propiedades de la doble hélice: la secuencia de nucleótidos y la estructura topológica de la molécula. La secuencia de nucleótidos dicta el sitio en el cual la Topo se va a unir al ADN; sin embargo, aunque la enzima tiene preferencia por ciertas secuencias, su especificidad está lejos de ser tan rigurosa como por ejemplo la de las endonucleasas de restricción. Esta falta de rigurosidad es, probablemente, importante para las funciones fisiológicas de las Topoisomerasas ya que permite a la enzima actuar en cualquier punto del genoma con problemas topológicos.

El estado topológico del ADN también modula la unión de la enzima a su sustrato, ya que la enzima puede discernir entre estructuras topológicas distintas e interacciona preferentemente (de 3 a 10 veces más) con ácidos nucleicos superenrollados que con moléculas relajadas (Osheroff y col., 1983; Osheroff, 1986; Zechiedrich y Osheroff, 1990).

Esta capacidad para reconocer distintos estados topológicos de una misma molécula de ADN permite a la enzima distinguir entre el sustrato y el producto de su reacción catalítica.

Una vez que se ha unido a su sustrato, la Topo I rompe una de las hebras del dúplex de ADN y cataliza la transferencia de una unión fosfodiéster desde el ADN hasta un residuo específico de la enzima, de manera que se forma un intermediario covalente ADN-proteína entre un residuo tirosina de la enzima y el extremo 3' fosfato de la rotura en el ADN, llamado "complejo de rotura". La energía del enlace fosfodiéster se conserva, ya que un residuo de tirosina de la enzima actúa transitoriamente como receptor y donante del extremo fosforilo de la hebra rota.

La Topo II, por su parte, rompe ambas hebras del dúplex de ADN formando extremos cohesivos de 4 pb escalonados. La rotura de cada una de las hebras es mediada por una subunidad de la enzima homodimérica (Zechiedrich y col., 1989). Cada subunidad de la Topo II queda entonces unida por un enlace covalente O⁴-fosfotirosina a uno de los extremos 5' final de la rotura formándose también en este caso el "complejo de rotura". En el caso de las Topoisomerasas de tipo II este paso requiere la presencia de un catión divalente (Osheroff, 1987; Osheroff y Zechiedrich, 1987). La Topo II "in vivo" utiliza Mg²⁺, pero "in vitro", el Ca²⁺, y en menor extensión el Mn²⁺ y el Co²⁺, pueden sustituir al Mg²⁺ (Bauer, 1978; Lee y col., 1989).

En el caso de la Topo I, una vez que la enzima ha creado una mella en una de las dos hebras del ADN de doble cadena, la región adyacente a la rotura puede rotar sobre la hebra intacta. En el caso de la Topo II, un segmento de ADN de dos cadenas intacto pasa a través de la puerta proteica que ha sido creada en la otra molécula de ADN. Este paso requiere la unión de una molécula de ATP a la enzima pero no su hidrólisis (Osheroff y col., 1983; Osheroff, 1989a).

Posteriormente se ligan los extremos rotos; este paso puede tener lugar después de cada ciclo de "paso de la hebra", o después de varios ciclos a fin de devolver al ADN su integridad inicial. Como vimos, aunque al principio se propuso la posible participación de una ligasa en este paso, es la propia Topoisomerasas la que lo lleva a cabo.

Una vez que las roturas en el ADN han sido selladas, la Topoisomerasa sufre un cambio conformacional que regenera el estado activo de la enzima y le confiere la capacidad de disociarse de su ADN producto.

En el caso de la Topo II, este cambio conformacional requiere la hidrólisis de una molécula de ATP hasta ADP y ortofosfato (Wang, 1985; Osheroff, 1989a).

1.7 PAPEL BIOLÓGICO DE LAS TOPOISOMERASAS

Las Topoisomerasas pueden participar en procesos celulares de dos formas: indirectamente, controlando el estado de superenrollamiento del ADN así como su estado de encadenamiento y anudamiento, y directamente, participando en procesos que requieren una rotura y reunión acoplada de la molécula de ADN.

1.7.1 Topoisomerasas y el superenrollamiento intracelular del ADN

El ADN circular de dos cadenas covalentemente cerrado aislado de células se encuentra superenrollado negativamente, con una diferencia en el número de enlace que va de -0.03 a -0.09 dependiendo de la fuente (Bauer, 1978). En células eucariotas la mayoría del superenrollamiento puede ser explicado por la unión de las histonas al ADN combinado con la actividad de relajación de una Topoisomerasa de ADN. La unión de los octámeros de histonas al ADN para formar nucleosomas resulta en un superenrollamiento negativo del ADN sobre el complejo histónico, de modo que si no fuera por la actividad Topoisomerasa la parte del ADN que está fuera del nucleosoma permanecería superenrollado positivamente. Este mecanismo permite la ausencia de estrés torsional en el ADN nuclear eucariota.

1.7.2 Topoisomerasas en replicación

Las Topoisomerasas de ADN podrían jugar varios papeles en la replicación del ADN:

a) En la fase de iniciación de la replicación, el grado de superenrollamiento influye en la unión de factores requeridos para el comienzo de la replicación.

b) La replicación es un proceso que genera superenrollamiento positivo por delante y negativo por detrás de la maquinaria de replicación, conforme esta avanza. Si hay barreras que impiden la libre rotación del complejo de replicación puede darse una acumulación estable del superenrollamiento, y por ello durante la fase de elongación es indispensable una Topoisomerasa capaz de relajar el superenrollamiento y eliminar el estrés que, de otra forma, se acumularía en la molécula de ADN. Esta actividad de relajación podría ser llevada a cabo tanto por Topo I como por Topo II. En ausencia de Topo I, sin embargo, la elongación de las cadenas se retrasa en las primeras fases de la replicación. Por otro lado, mutaciones en Topo II tienen poco efecto en la tasa de elongación de la cadena, sugiriendo que la Topo I debe ser importante, al menos en esta fase de la replicación, y que ésta debe ser la enzima que normalmente actúa eliminando el superenrollamiento que se origina durante esta fase del ciclo (Kim y Wang, 1989).

c) Al final de la replicación, se forman productos encadenados (Holm, 1994) que una Topoisomerasa podría resolver por medio de roturas de cadena simple o doble. La Topo I purificada, en ausencia de Topo II, permite la replicación completa del ADN del virus SV40 en un sistema de replicación *in vitro* (Yang y col., 1987), sin embargo, los productos de la replicación permanecen enlazados. La Topo II, por el contrario, sí puede sustituir completamente a la Topo I en un sistema *in vitro*. En eucariotas existen datos muy representativos procedentes de estudios realizados en levaduras con la Topo II mutada. En estos mutantes termosensibles se observa la acumulación de plásmidos en forma de múltiples dímeros encadenados después de una ronda de replicación a temperatura no permisiva (Caron y col., 1994). Este papel crucial de la Topo II para una correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis se ha observado también en *Drosophila melanogaster* (Buchenau y col., 1993) y en células de mamífero (Downes y col., 1994). La Topo II parece ser por tanto crucial al final de la replicación para el desencadenamiento de cromosomas encadenados *in vivo*.

1.7.3 Topoisomerasas en transcripción

Durante la transcripción también se generan tensiones topológicas que hay que eliminar, de manera que sea posible la rotación de un segmento de ADN alrededor de su eje en vez de la rotación de toda la cadena naciente de ARN alrededor del ADN. El descubrimiento de las Topoisomerasas naturalmente dirigió la discusión hacia la posible implicación de estas enzimas en la transcripción, además de en la replicación (Botchan y col., 1973). Diversas pruebas directas e indirectas han sugerido que en eucariotas, la Topo I en particular puede estar especialmente implicada en esta función. Esta enzima se ha localizado asociada con loci transcripcionalmente activos mediante tinción con inmunofluorescencia del nucleolo de *Drosophila* (Fleischmann y col., 1984), y se ha demostrado además que el nucleolo, donde hay una alta actividad transcripcional, está enriquecido en Topo I (Muller y col., 1985); de hecho, la síntesis de ARNr se puede bloquear mediante la microinyección de anticuerpos anti-Topo I en el núcleo celular, y esta inhibición se puede revertir mediante la adición de Topo I exógena (Egyhazi y Durban, 1987). Todo esto sugiere, de forma clara, que la Topo I es un componente esencial durante la transcripción.

Por otro lado, se ha demostrado que el estado de superenrollamiento de ciertas zonas del genoma puede influir en la expresión génica de eucariotas (Weisbrod, 1982; Lilley, 1983; Schon y col., 1983; Selleck y col., 1984) y que la Topo I posiblemente esté implicada en la

iniciación de la transcripción a través de la modulación del nivel de superenrollamiento del ADN (Di Mauro y col., 1993; Menzel y Gellert, 1994).

1.7.4 Topoisomerasas en recombinación

Paradójicamente, aunque las Topoisomerasas de ADN son indispensables para el mantenimiento de la estabilidad genómica, podrían también alterar dicha estabilidad en ciertas condiciones. La capacidad de las Topoisomerasas para romper y reunir hebras de ADN y para llevar a cabo transferencias intermoleculares sugiere que estas enzimas podrían catalizar la rotura y reunión de las hebras de ADN durante la recombinación. De hecho se ha descrito la existencia de recombinación ilegítima mediada por Topo II tanto *in vitro* (Bae y col., 1988) como *in vivo* (Han y col., 1993; Negrini y col., 1993). Por otro lado, existen cepas mutantes de levadura que muestran frecuencias de recombinación muy elevadas y cuya Topo I forma complejos de rotura más estables que los de la cepa silvestre (Levin y col., 1993).

Se ha propuesto también a las Topoisomerasas como intermediarias para explicar el origen de los intercambios entre cromátidas hermanas (SCEs) en diferentes modelos (Ishii y Bender, 1980; Painter, 1980; Pommier y col., 1985) como responsables de producir cortes, uniones covalentes y reunión de cadenas de ADN.

1.7.5 Topoisomerasa II en el mantenimiento de la estructura genómica

La Topoisomerasa II parece tener además un papel estructural, ya que es crucial para el mantenimiento de los lazos topológicamente independientes, que forman la complicada arquitectura del ADN genómico gracias a interacciones específicas con ciertas secuencias ricas en AT del ADN. Las regiones del ADN que se unen al andamiaje proteico durante metafase o a la matriz nuclear en interfase están enriquecidas en secuencias de unión de Topo II (Gasser y Laemmli, 1986). La Topo II es uno de los componentes principales del andamiaje de los cromosomas (Laemmli y col., 1992) y es capaz de mantenerse unida a los lazos de cromatina incluso en cromosomas que han perdido la mayoría de sus proteínas mediante extracción con sales o detergentes no iónicos (figura 15).

La Topoisomerasa I, sin embargo, no es una proteína estructural, ya que se puede extraer de la cromatina a fuerzas iónicas

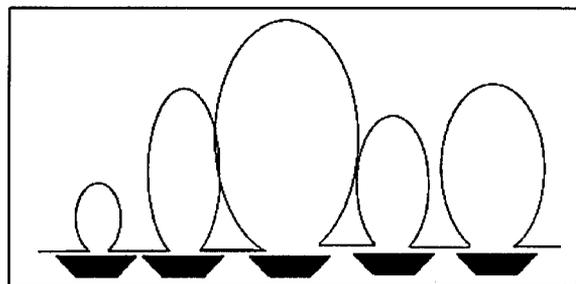


Figura 15. Topoisomerasa II con función estructural.

relativamente bajas (Shero y col., 1986) y se encuentra distribuida homogéneamente a lo largo de los lazos de cromatina de los cromosomas mitóticos (Earnshaw y Heck, 1985).

1.7.6 Topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN

Debido a las funciones que estas enzimas desempeñan y a los mecanismos de acción que poseen, se ha considerado a las Topoisomerasas de ADN como buenas candidatas para intervenir en los procesos de reparación llevados a cabo en la célula después de que agentes físicos o químicos hayan provocado algún tipo de daño en el ADN. Se ha propuesto que el papel desempeñado por estas enzimas podría ser directo, participando en los mecanismos moleculares de reparación de la lesión, como por ejemplo en la reparación de roturas de cadena del ADN o en la escisión de bases dañadas. Alternativamente, podría actuar de forma indirecta en los pasos preparatorios que llevaría consigo la relajación de la cromatina de forma que se favorezca una mejor accesibilidad de las enzimas de reparación al ADN dañado (Cortés y Pastor, 2001a).

La investigación de la posible implicación de las Topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN se ha basado principalmente en las fluctuaciones de las actividades y los niveles de las Topo I y II después del tratar células de mamíferos con un agente físico o químico, además de en la existencia de una posible correlación entre proteínas Topoisomerasas anormales y la sensibilidad o resistencia a la radiación.

Teniendo en cuenta los resultados hasta ahora publicados acerca de la posible implicación de las Topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN producido por agentes físicos o químicos, se han establecido distintas hipótesis acerca de su intervención en dicha función celular básica para el mantenimiento de la integridad del genoma.

a) Implicación en una fase previa a la reparación

Diversos trabajos de investigación apoyan la idea de que la Topo II α podría estar implicada en pasos preparatorios para la reparación por escisión. La cromatina densamente empaquetada, cuando se daña por luz UV o por radiación de alta energía, pierde de forma transitoria este grado de empaquetamiento compacto para permitir la accesibilidad de las enzimas de reparación por escisión a los sitios dañados, en particular de las helicasas y endonucleasas. La pérdida de afinidad por parte de las histonas hace que los dominios de ADN adopten un estado de fuerte superenrollamiento negativo. Este ADN “desnudo” topológicamente forzado o restringido es un mal sustrato para las enzimas de reparación (posiblemente por un impedimento para que las enzimas de reparación accedan a los sitios

dañados) a menos que la Topoisomerasa II α (o la Topoisomerasa I) libere esta restricción haciendo así que la reparación del ADN sea más fácil (Thielmann y Popanda, 1998a). De hecho, se ha observado que la incisión y la síntesis de reparación del ADN se ve debilitada en fibroblastos humanos irradiados con UV en presencia de distintos inhibidores de Topo II (Popanda y Thielmann, 1992; Thielmann y col., 1993).

De acuerdo con estas consideraciones, la acción de la Topoisomerasa II α tendría una función preparatoria en la reparación ya que precedería antes del paso de incisión específica de la reparación del ADN.

Debido a su posición estratégica en las bases de los bucles y a la reacción que cataliza, la Topo II es muy probable que controle el grado de superenrollamiento dentro de los bucles, liberando el estrés producido durante la replicación y la transcripción (Thielmann y Popanda 1998b). Dada esta función, la enzima podría jugar también un papel en la reparación, ya que cuando existe daño, el grado normal de empaquetamiento de la cromatina dañada tiene que perderse transitoriamente para facilitar la accesibilidad de las enzimas de reparación a los sitios dañados en el ADN.

b) Implicación en la transcripción de genes de respuesta al daño

De forma general se sabe que la irradiación de las células con luz UV o con rayos X estimula la transcripción de un gran número de genes, conocidos como genes de respuesta al daño en el ADN (Holbrook and Fornace, 1991; Herrlich y col., 1992 y 1994; Keyse, 1993). Este estímulo de la transcripción es probable que requiera un aumento en los niveles de Topo I o II, o de ambas. La implicación de la Topo I en la iniciación y elongación de la transcripción fue descrita por Wang (1996). Así, es tentador especular que la ya investigada asociación de la Topo I con las regiones transcripcionalmente activas del genoma (Fleischmann y col., 1984) podría estar estrechamente conectada con la reparación por escisión preferencial que tiene lugar en dichas regiones (Bohr y col., 1985; Cortés y Pastor, 2001a).

En células no irradiadas, se observó por inmunotinción que la Topo I se localizaba principalmente en el nucleolo. Se sabe que la enzima está asociada con la ARN polimerasa I (Pommier y Bertrand, 1993). La irradiación llevó, de manera dosis-dependiente, a la aparición de nuevos centros de actividad Topo I (Thielmann y Popanda, 1998a), y parece razonable asumir que estos focos representan nuevos sitios de transcripción génica. De hecho, la Topo I de humanos se identificó como parte del complejo TFIID (Merino y col., 1993; Kretschmar y col., 1993).

En cuanto a la Topo II, se sabe menos sobre la posibilidad de que dicha enzima juegue un papel activo en la transcripción. Se vio que inhibidores de la Topo II bloqueaban selectivamente la transcripción del gen “homeobox” *Hox-2.1* (Ura y Hirose, 1991). Además, los sitios de corte de la Topo II se localizaron en las mismas regiones en las que estaban los sitios hipersensibles a DNAsas, conocidos como genes transcritos activamente 5' o 3' (Kroeger y Rowe, 1989; Reitman y Felsenfeld, 1990), y en regiones con niveles aumentados de transcripción, sugiriendo un papel de la Topo II en la función de estos estimuladores/activadores (Cockerill y Garrard, 1986; Gasser y Laemmli, 1987). Pommier y Bertrand (1993) en su trabajo sobre el posible papel de la Topo II en la transcripción llegaron a conclusiones en apoyo del mismo, ya que observaron en sus experimentos que sus secuencias de unión al ADN (regiones asociadas a matriz) se encuentran a menudo muy próximas a promotores y corriente arriba de secuencias reguladoras (Gasser y Laemmli, 1987). La transcripción de ARNr y de la ARN polimerasa I es críticamente dependiente de la presencia de la Topo I o II (Brill y col., 1987). La Topoisomerasa de ADN II β , por otra parte, parece también estar implicada en esta función (Tsutsui y col., 1993). Teniendo en cuenta las citadas evidencias, parece que la inducción de la Topo II α , podría participar también en la transcripción.

En general, podemos considerar que el incremento de las actividades de las Topoisomerasas observado después de la irradiación podría ser consecuencia de su participación en la transcripción de gran cantidad de genes que forman parte de la respuesta general de la célula al daño en el ADN.

c) Implicación en la reparación por recombinación

Además de lo expuesto anteriormente también podemos considerar una implicación directa de las Topoisomerasas, de tipo I y/ o tipo II, en los procesos de reparación por recombinación. Existen fuertes evidencias de que las Topoisomerasas (principalmente la Topo II) son capaces de estimular la recombinación tanto *in vivo* como *in vitro* (Halligan y col., 1982; Ikeda y col., 1982; Bullock y col., 1985; Ikeda, 1986; Bae y col., 1988; Zhu y Schiestl, 1996). Mientras que la mayoría de los artículos publicados apuntan a que la recombinación promovida por las Topoisomerasas es del tipo ilegítima (no-homóloga), no podemos descartar que promueva la recombinación homóloga (Cortés y Pastor, 2001b).

La Topo I y II son recombinasas con actividades de transferencia de cadenas de ADN intra e intermolecular (Halligan y col., 1982; Gale y Osheroff, 1992). Estudios en levaduras expresando diferentes niveles de Topo I muestran una asociación directa entre los niveles de

Topo I y la integración ilegítima de ADN no-homólogo extracelular. Las secuencias que son puntos calientes para la integración de ADN se corresponden con las secuencias identificadas previamente como sitios de rotura preferidos por la Topo I (Zhu y Schiestl, 1996). También se ha implicado a la Topo II en algunas formas de recombinación ilegítima en humanos. Estudios recientes sugieren que el daño espontáneo en el ADN, como sitiosapurínicos, apirimidínicos y residuos de citosina desaminados podrían estimular las roturas mediadas por la Topo II y la recombinación (Kingma y col., 1997; Larsen y col., 1998).

Hasta ahora no existen evidencias experimentales que relacionen este posible mecanismo de recombinación mediado por las Topoisomerasas con la reparación del daño por radiación, por lo que esto sigue siendo sólo una hipótesis interesante.

1.8. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE LAS TOPOISOMERASAS A LO LARGO DEL CICLO CELULAR EUCARIÓTICO

Ensayos de la actividad Topo II, tanto en extractos libres de células como *in vivo*, sugieren que los niveles de esta enzima son mayores en células proliferantes que en células en estado quiescente, de manera que la Topo II puede tomarse como marcador específico de la proliferación celular. Por el contrario, la Topo I ha sido detectada en distintas líneas celulares a niveles de actividad equiparables tanto en estado proliferativo como en estado quiescente (Duguet y col., 1983).

Existe además una regulación de los niveles de Topo II dependiente de la fase del ciclo celular, de manera que se observa un incremento en la cantidad de la enzima justo antes de, o en la entrada de la célula en la fase de replicación (G1/S), y continúa aumentando a través de S y G₂, alcanzando el pico máximo al final de G₂ y principio de mitosis (figura 9). Este aumento en la concentración de Topo II antes de la mitosis es compensado con un agudo descenso en los niveles de actividad de la enzima en la fase G₁ del ciclo, debido tanto a cambios en los niveles de transcripción del gen (Adachi y col., 1997) como a fluctuaciones en la estabilidad del ARNm a lo largo del ciclo (Goswami y col., 1996).

A diferencia de la Topo II, los niveles de Topo I se expresan de manera constitutiva, y permanecen constantes en las distintas fases del ciclo celular y su estabilidad no varía durante la mitosis (Heck y col., 1988) (figura 16).

La actividad Topoisomerasa también puede ser regulada mediante la unión transitoria de polímeros de ADP-ribosa. Así, la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Ogata y col., 1981), es capaz de provocar una disminución en la actividad catalítica de la Topo I y II (Ferro y

Olivera, 1984; Darby y col., 1985), y de otras muchas proteínas, mediante la adición de dímeros de ADP-ribosa.

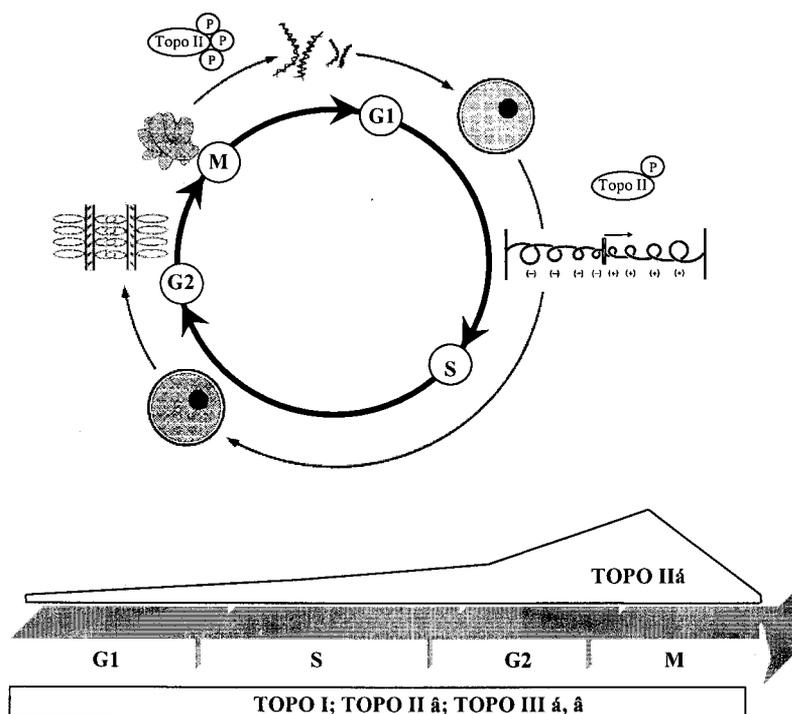


Figura 16. Regulación de la actividad de las Topoisomerasas durante el ciclo celular eucariótico.

Otra modificación postraducional que puede regular la actividad Topoisomerasa consiste en la fosforilación de la proteína. La Topo I necesita estar fosforilada en el dominio amino terminal para ser completamente funcional (Staron y col., 1995), mientras que la fosforilación de la Topo II en el extremo carboxilo terminal también provoca un aumento en la actividad de la enzima. El nivel de fosforilación de la Topo II depende tanto del estado de proliferación celular como de la posición en el ciclo, y aumenta más de 10 veces cuando la célula progresa de G₂ a M (Cardenas y Gasser, 1993). El aumento en la cantidad de Topo II al final de S y principio de G₂, junto con el aumento en su actividad enzimática tras la fosforilación máxima en G₂/M, han conducido a asociar la degradación de Topo II con el proceso de descondensación cromosómica en G₁ y a implicar a la Topo II fosforilada en procesos tales como la condensación y segregación cromosómica durante mitosis y meiosis (Adlakha y Rao, 1986; Wood y Earnshaw, 1990; Adachi y col., 1991; Rose y Holm, 1993).

1.8.1 Topoisomerasa II y condensación cromosómica

Los modelos actuales sugieren que la reorganización estructural que sufren las células durante la mitosis es conducida primariamente por los rápidos cambios de actividad que sufren determinadas proteínas tras ser fosforiladas en respuesta a determinadas señales intracelulares (Russell y Nurse, 1987). Pero los cambios que ocurren durante la mitosis no son sólo debidos a modificaciones postraduccionales sino también a cambios en los niveles de proteínas, como es el caso de la mayoría de la proteína Topo II que no es reutilizada en ciclos celulares sucesivos. Existen pruebas tanto a nivel bioquímico como a nivel genético que demuestran que la Topo II de eucariotas es necesaria para que los cromosomas metafásicos alcancen el estado final de condensación y, probablemente, para ciertas fases de descondensación (Buchenau y col., 1993; Ishida y col., 1994); de hecho, la formación de cromosomas mitóticos y la estabilidad de la Topo II pueden estar íntimamente relacionadas ya que el ciclo de síntesis/degradación de la Topo II coincide con el ciclo de condensación/descondensación de los cromosomas mitóticos (Uemura y col., 1987).

El descenso en la vida media de la Topo II en células postmitóticas puede ser una consecuencia de la descondensación de los cromosomas mitóticos o alternativamente, la degradación gradual de la Topo II puede contribuir en buena medida a la descondensación de los cromosomas mitóticos.

1.8.2 Topoisomerasa II y segregación cromosómica

Como ya hemos mencionado, el análisis de mutantes termosensibles para la Topo II de *S. cerevisiae* (Adachi y col., 1991) y *S. pombe* (Uemura y col., 1987), ha demostrado que esta enzima es requerida para la segregación cromosómica en mitosis y en meiosis, durante la cual la enzima desenmaraña las hebras hijas que aparecen entrelazadas tras la replicación. En organismos pluricelulares, por otra parte, se ha observado que la inhibición de la actividad Topo II igualmente impide la correcta separación de los cromosomas hijos en anafase (Buchenau y col., 1993). Este fallo en la correcta segregación de moléculas de ADN recién replicadas conduce a la formación de células endorreduplicadas y en último término a la muerte celular.

La endorreduplicación consiste en dos rondas sucesivas de replicación del ADN sin intervenir la mitosis, es decir sin que se produzca la segregación de las cromátidas hermanas (Cortés y col., 1987; Sumner, 1998). La manifestación mitótica visible de este fenómeno es la presencia de diplocromosomas, formados por 4 cromátidas, en lugar de las dos cromátidas que se observan normalmente en los cromosomas metafásicos (figura 17).

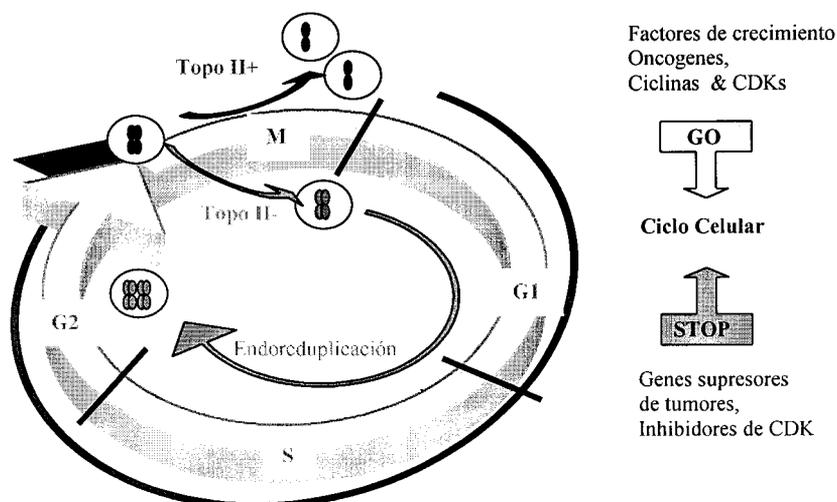


Figura 17. Producción de células endorreduplicadas.

Se ha visto que un grupo de compuestos que bien por alterar el ensamblaje del citoesqueleto, como la colchicina o la concanavalina A (Rizzoni y Palitti, 1973; Sutou, 1981), o por provocar daño en el ADN (Sutou y Tokuyama, 1974; Kusyk y Hsu, 1979; Huang y col., 1983; Lüke-Huhle, 1983), dan lugar a la producción de células endorreduplicadas en diferente grado. Recientemente se han utilizado agentes que interfieren con la Topo II con el propósito de analizar si esta enzima es necesaria para la segregación de los cromosomas hijos en mitosis. Como resultado de estos estudios se ha demostrado que los inhibidores de las Topoisomerasas son capaces de inducir endoreduplicación (Ishida y col., 1994; Sumner, 1998) ya que previenen el desencadenamiento de los cromosomas replicados, llevado a cabo por la Topo II, con el subsiguiente fallo en cuanto a completar una mitosis normal.

1.9 INHIBIDORES DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN

Podemos diferenciar dos grandes grupos de compuestos que inhiben a las enzimas Topoisomerasas. Por un lado se encuentran los denominados venenos, debido a que ejercen su función mediante la estabilización del complejo de rotura, provocando serios problemas en la vida de las células. Recientemente se ha establecido otro grupo de compuestos que provocan la inhibición de la enzima de forma independiente a la estabilización del complejo de rotura, pudiendo actuar a distintos niveles; a este grupo se les conoce como inhibidores catalíticos.

1.9.1 Venenos de Topoisomerasas

La capacidad de las Topoisomerasas para pasar una hebra o una doble hebra de ADN libremente a través de una rotura puede cobrarse un alto precio ya que requiere que la enzima genere roturas en el material genético. En un esfuerzo para mantener la integridad genética durante esta reacción de rotura, las Topoisomerasas se unen covalentemente a los extremos generados en el ADN formando, como mencionamos anteriormente, el “complejo de rotura”. En condiciones normales estos complejos ADN-enzima son breves intermediarios catalíticos presentes a concentraciones muy bajas y perfectamente tolerados por la célula. Sin embargo, un aumento significativo en la concentración fisiológica o en la vida media de estos complejos desataría una serie de efectos deletéreos para la célula.

Las Topoisomerasas de ADN son el blanco principal de una serie de agentes antitumorales (D'Arpa y Liu, 1989; Liu, 1989; Capranico y Zunino, 1992) que, a diferencia de la mayoría de los agentes que tienen como blanco a enzimas celulares, no ejercen su acción terapéutica a través de la inhibición catalítica de la enzima, sino a través de un mecanismo que tiene como resultado la producción de daño en el ADN. Estos agentes se conocen con el nombre de venenos de Topoisomerasas (Liu, 1989) y bloquean de forma específica y reversible el paso de ligación de las roturas llevado a cabo por estas enzimas atrapando al intermediario ADN-Topo e incrementando por tanto la concentración de Topoisomerasa unida covalentemente a extremos rotos de ADN (Corbett y Osheroff, 1993; Pommier, 1993; Chen y Liu, 1994). Esta acción convierte a las Topoisomerasas en toxinas fisiológicas ya que introducen en el genoma de las células tratadas con estas drogas altos niveles de roturas transitorias asociadas a proteínas (figura 18).

El único veneno de Topo I bien caracterizado es la camptotecina (CPT), alcaloide que procede del árbol Chino *Camptotheca accuminata*. En un principio se observó que poseía actividad antitumoral contra la leucemia y tumores sólidos y años más tarde, en 1985 se

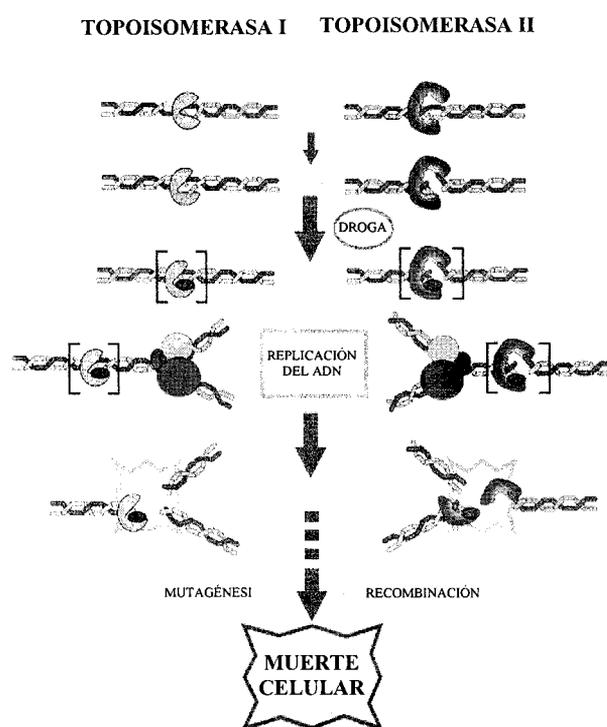


Figura 18. Producción de muerte celular por los venenos de Topoisomerasas.

sucesivos ha conducido a una intensa investigación de nuevos venenos de Topoisomerasas como drogas más efectivas y selectivas como es el caso de los derivados hidrosolubles de la CPT, el topotecan, la CPT-11 (cuyo metabolito activo es el SN-38), la 9-aminocamptotecina, etc., los cuales presentan en general una mayor actividad antitumoral que la CPT y un efecto tóxico menor (Slichenmyer y col., 1993).

La Topo II de mamífero ha sido también identificada como el blanco celular de una gran variedad de compuestos estructuralmente diferentes, con capacidad antitumoral (algunas de ellas se representan en la figura 19) (Fortune y Osheroff, 2000). La mayoría de estos agentes son intercalantes, pero esta capacidad de intercalación en el ADN no parece ser indispensable para el desarrollo de su capacidad antitumoral.

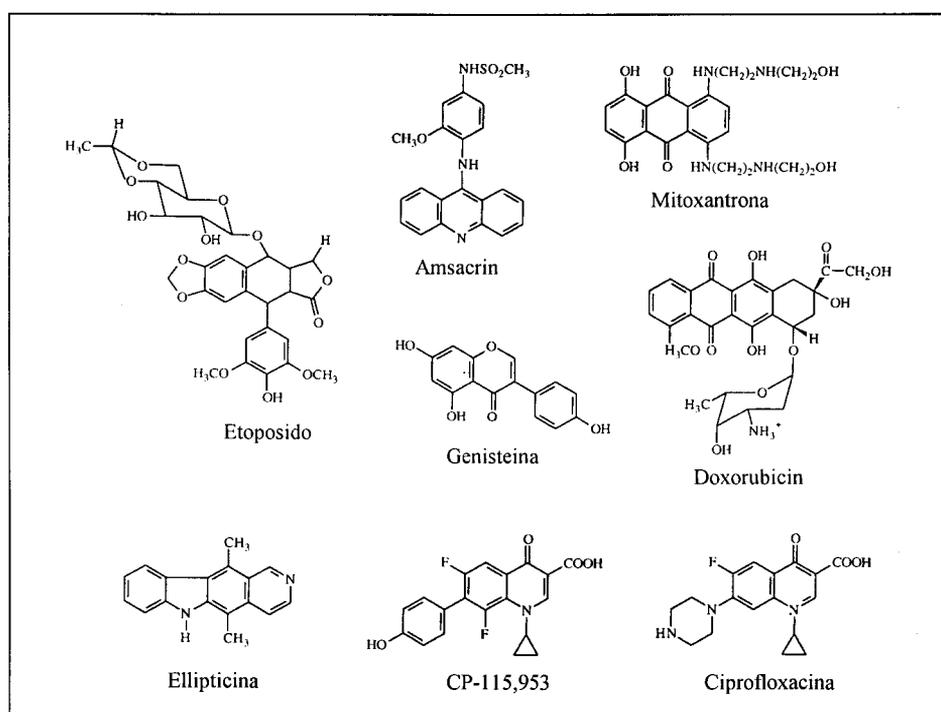


Figura 19. Estructura molecular de venenos de Topo II.

Parece que existen dos mecanismos generales distintos, aunque no mutuamente excluyentes, mediante los cuales los venenos de Topo II actúan sobre la enzima. Algunos, tales como etoposido inhiben fuertemente el paso de reunión del ADN mediado por la enzima (Osheroff, 1989b; Robinson y Osheroff, 1990; Robinson y Osheroff, 1991; Sørensen y col., 1992). Sin embargo, otros compuestos, tales como la quinolona CP-115, 953, tienen un menor o ningún efecto en la eficacia de religación, y se piensa que actúan principalmente aumentando la capacidad de la Topo II para producir roturas en la molécula de ADN (Sørensen y col., 1992; Corbett y Osheroff, 1993; Froelich-Ammon y col., 1995; Cline y col.,

1997). El mecanismo exacto por el cual estas últimas incrementan los niveles de corte en el ADN sin afectar a la tasa de reunión de las roturas no se conoce aún.

1.9.2 Inhibidores catalíticos de las Topoisomerasas

En los últimos años se han descubierto una serie de compuestos que inhiben la actividad catalítica de la Topo II (para la Topo I no se han identificado aún inhibidores catalíticos específicos) pero, a diferencia de los clásicos venenos de Topoisomerasas, éstos no estabilizan el complejo de rotura. A este grupo se les conoce como inhibidores catalíticos y son de gran interés, ya que parecen eludir el fenotipo de resistencia a multidroga (Jensen y col., 1990; Beck and Danks, 1991; Chen and Beck, 1993) y además pueden actuar como antagonistas de los venenos de Topo II (Andoh e Ishida, 1998). Estos compuestos incluyen merbarona (Drake y col., 1989a), fostriecina (Boritzki y col., 1988), aclarubicina (Jensen y col., 1991), suramin (Bojanowski y col., 1992), quinobenoxazina (A-74932) (Permana y col., 1994), bisdioxopiperazinas (Tanabe y col., 1991; Ishida y col., 1991), chloroquina (Jensen y col., 1994) y novobiocina (Utsumi y col., 1990) (algunos de estos inhibidores se representan en la figura 20). Los mecanismos de acción de estos compuestos se piensa que son diferentes de los venenos de Topo II que estabilizan el complejo de rotura, aunque los mecanismos de acción sobre la enzima y la citotoxicidad por ellos producida están aún poco definidos.

En este trabajo se han empleado los inhibidores catalíticos ICRF-193 (meso-2,3-bis(3,5-dioxopiperazinil)butano) perteneciente al grupo de las bisdioxopiperazinas, y el bufalin, los cuales describimos a continuación.

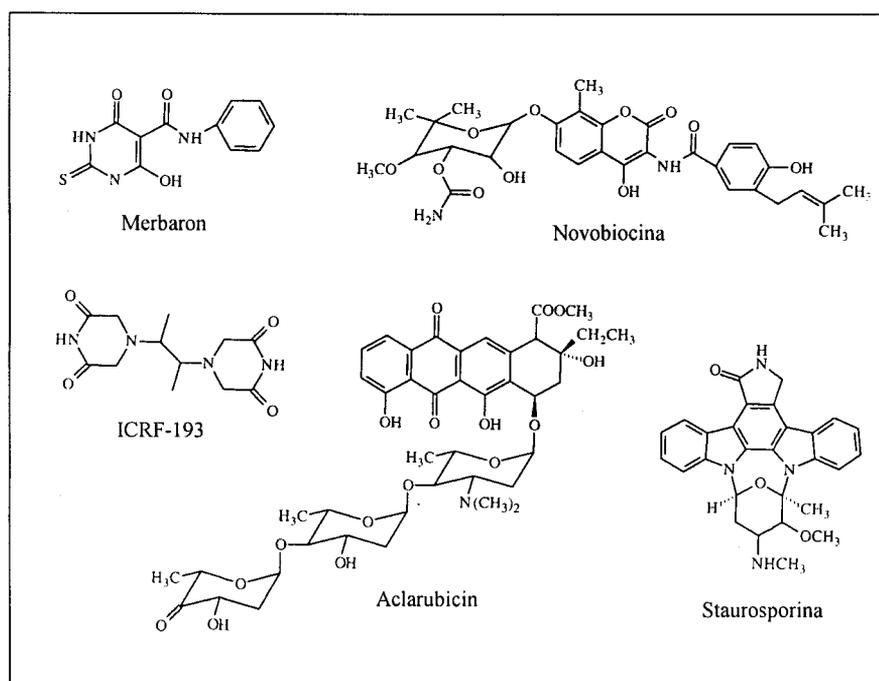


Figura 20. Estructura molecular de inhibidores catalíticos de Topo II.

Bis(2,6-dioxopiperazinas)

Las bis(dioxopiperazinas) fueron sintetizadas originalmente por Creighton y colaboradores (1969) como potenciales agentes quelantes intracelulares. Entre sus propiedades bioquímicas y farmacológicas, se incluyen sus actividades antitumoral y cardioprotectora, que fueron estudiadas extensamente en la década pasada (revisado por Herman y col., 1982), antes de que la Topo II se identificara como su blanco celular. Así estos compuestos mostraron actividad contra algunos tumores inducidos experimentalmente (Creighton y col., 1969) y en enfermos con leucemia aguda y linfosarcoma (Hellmann y col., 1969). Las observaciones iniciales del efecto antitumoral del ICRF-154 y -159 condujeron a un estudio sistemático de una familia de bis(dioxopiperazinas) en los laboratorios del Imperial Cancer Research Fund del Reino Unido, de ahí sus siglas (Herman y col., 1982). La aclaración del modo real de acción de los compuestos tuvo que esperar hasta 1991 en que fue descubierto por Tanabe y col. (1991) su naturaleza como inhibidores de la Topo II (de mamíferos). Entre ellos, el ICRF-193 (figura 21) resultó ser el compuesto que presentaba una mayor eficacia como inhibidor, aunque presentaba una toxicidad demasiado alta para poder emplearse como agente antitumoral, debido a su excesivo carácter lipofílico (Pommier, 1997; Andoh, 1998).

Análisis más recientes han demostrado que, en presencia de ICRF-193, las células son capaces de atravesar varias rondas del ciclo de división celular, con su genoma replicado, pero no segregado, con el resultado

de poliploidización (Ishida y col., 1994). Lo interesante de estos resultados es que son similares a aquellos observados en mutantes termosensibles *top2* de levaduras a temperatura no permisiva (Uemura y col., 1987). Con base a estas observaciones se ha propuesto que las 2,6-dioxopiperazinas pueden ser de gran utilidad para estudiar las funciones biológicas de la Topo II en una gran variedad de organismos (Takasuga y col., 1995).

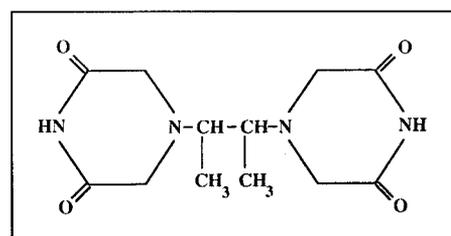


Figura 21. Estructura del ICRF-193.

Bufalin

Se ha visto que el bufalin (figura 22), un componente de los “bufadienolides” en la medicina tradicional China, *chan'su*, el cual se obtiene de glándulas venenosas de la piel de anuros, inhibe selectivamente el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer humano (Zhang y col., 1992; Jing y

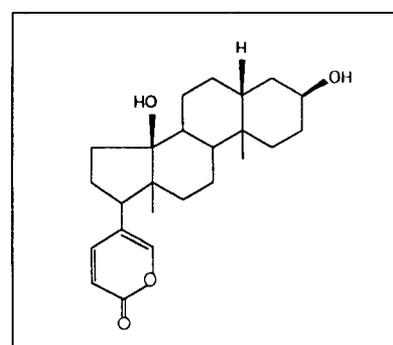


Figura 22. Estructura del bufalin.

col., 1994a). El tratamiento con bufalin a bajas concentraciones (de 10^{-9} a 10^{-8} M) sobre un grupo de líneas celulares de leucemias humanas, inducía diferenciación (Zhang y col., 1992), mientras que a concentraciones de 10^{-7} M y mayores inducía apoptosis (Jing y col., 1994a). Debido al hecho de que los inhibidores de Topo (venenos) inducían apoptosis en varias líneas celulares (Kaufman y col., 1989; Bertrand y col., 1993; Barry y col., 1993; Onishi y col., 1993; Yoshida y col., 1993), se planteó la posibilidad de que el bufalin actuase sobre la Topo II. Experimentos llevados a cabo por Hashimoto y colaboradores (1997) confirmaron que, efectivamente el tratamiento con bufalin provocaba una marcada disminución de la cantidad y actividad Topo II.

Está demostrado que el bufalin, además de los efectos sobre la Topo II, induce apoptosis en varias líneas celulares de tumores humanos, alterando la expresión de genes relacionados con apoptosis (Masuda y col., 1995; Watabe y col., 1997; Kawazoe y col., 1999a). Además se ha visto que el bufalin inhibe específicamente la ATPasa Na^+/K^+ (Watabe y col., 1997; Kawazoe y col., 1999 b; Kurosawa y col., 2000) de células tumorales humanas, pero no de ratón, y ya que esta inhibición conduce a un cambio en la concentración intracelular de iones Na^+ , se sugirió que el bufalin induce apoptosis en células tumorales humanas de forma selectiva y mediante la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ , la cual actúa aguas arriba de la proteína bcl-2 (kawazoe y col., 1999b).

OBJETIVOS

En los últimos 20 años se ha propuesto la posibilidad de que las Topoisomerasas de ADN estuviesen implicadas de alguna forma en la reparación del daño en el ADN, ya sea por un agente químico o físico. Por otra parte, el estudio del daño en el ADN, así como de los mecanismos de reparación de dicho daño ha suscitado un gran interés a lo largo de la historia científica, ya que de ellos depende la salud humana y de los seres vivos en general. Por ello, el conocimiento acerca de los sistemas de reparación y de las proteínas que en ellos intervienen aportaría nuevos datos de interés para una posible actuación sobre determinadas enfermedades humanas y poder así mejorar la calidad de vida.

Teniendo en cuenta la importancia de este tema, hemos intentado aportar nuevos conocimientos que apoyan la teoría de una posible implicación de las Topoisomerasas (en nuestro caso de la Topo II) en reparación (centrándonos en el daño producido por los rayos X).

Por nuestra parte, hemos abordado este problema siguiendo las pautas siguientes:

1.- Hemos estudiado la posible modulación de la actividad y cantidad de enzima Topo I y Topo II, a tiempos cortos después de la inducción de daño en el ADN mediante rayos X.

2.-Seleccionamos los inhibidores de Topo II bufalin e ICRF-193 para llevar a cabo un estudio comparativo y detallado a cerca del mecanismo de acción por el cual inhiben la actividad Topo II y de los efectos colaterales que desencadenan. De este estudio pretendíamos poder seleccionar al menos un inhibidor catalítico limpio, es decir, que no provocase daño en el ADN, para poder continuar con el siguiente objetivo.

3.-Estudiamos la posible modulación de la cinética de reparación cuando el daño en el ADN y la reparación del mismo se da en una situación en la que la enzima Topo II está inhibida.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO

Como material experimental se utilizaron las líneas celulares de fibroblastos de hámster Chino EM9, xrs-5 (ambas de ovario) e irs2 (de pulmón), las cuales presentaban mayor sensibilidad a distintos agentes mutagénicos, por presentar algún tipo de defecto en sus mecanismos de reparación. También se usaron sus correspondientes líneas parentales AA8, CHO K1 y V79 respectivamente, para el contraste de los resultados. Las líneas se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection) y se testaron periódicamente para comprobar la ausencia de micoplasmas.

Las líneas celulares AA8/EM9 y CHO K1/xrs-5 se cultivaron en monocapa en medio McCoy's 5 A, y las líneas celulares V79/irs2, también en monocapa, en medio esencial mínimo (MEM). Ambos medios se suplementaron con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, y los antibióticos penicilina (50 U/ml) y estreptomycinina (50 µg/ml). Los cultivos crecieron a 37 °C en oscuridad en una atmósfera con un 5% de CO₂ en el aire. Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron al menos tres veces con el fin de validar los resultados obtenidos.

2.2 ESTUDIOS DE SINCRONIZACIÓN CELULAR EN DISTINTAS FASES DEL CICLO

Se siguieron dos protocolos distintos de sincronización dependiendo de las líneas celulares (EM9, AA8; xrs-5, CHO-K1), debido a que éstas presentan distintas características en cuanto a su adherencia al sustrato.

Sincronización en fase de Mitosis(M). Este protocolo se aplicó en aquellas líneas celulares cuyas células mitóticas presentaban ninguna o una mínima adherencia al sustrato, por lo que pudimos separar células mitóticas del resto de las células en las otras fases del ciclo celular. Para ello se adicionó Colcemida (2×10^{-7} M) al medio de cultivo en células en crecimiento exponencial y tras incubar durante 3 h se recogieron las células mitóticas mediante golpes secos laterales en los frascos de cultivo ("shake-off") se lavaron varias veces para eliminar los restos de Colcemida y se volvieron a sembrar en varios frascos de cultivo a una densidad de 3×10^5 cels/ml con medio fresco. Las células de estos frascos se recogieron secuencialmente con intervalos de 2 h desde el momento en que las sembramos hasta completar un total de 16 h. Las células se recogieron con un rascador (cell scraper) y se reservaron, una vez fijadas, hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Para comprobar que más del 80% de las células que recogimos mediante "shake-off" estaban

sincronizadas en mitosis, se hizo una fijación de células inmediatamente después del “shake-off” (tiempo 0 h).

Sincronización en la fase G1. Se sincronizaron mediante este protocolo solo aquellas líneas celulares (V79, irs2; cuyas células mitóticas presentaban una alta adherencia al sustrato, similar al resto de la población celular. Para ello se mantuvo el cultivo celular hasta que las células alcanzaron el estado de confluencia, momento en el cual más del 90% de la población se encontraba sincronizada en la fase G1 del ciclo celular. El cultivo se tripsinizó (Tripsina-EDTA) y las células se sembraron en varios frascos, para más tarde, y de la misma forma que en el otro método de sincronización, recoger secuencialmente las células de cada frasco con un rascador y fijarlas para su posterior análisis por citometría de flujo. Al igual que antes, y para comprobar la sincronización, en este caso en G1, de las células antes de sembrarlas, se realizó una fijación a tiempo 0 h.

Estudios de sincronización por citometría de flujo.

Las células se recogieron secuencialmente y se fijaron con etanol frío al 70% a una concentración de 10^6 cels/ml, donde se mantuvieron como mínimo durante 30 min. A continuación, y después de centrifugar a 1000 rpm durante 6 min, las células se lavaron varias veces con PBS 1X y se resuspendieron en ARNasa (recién preparada) a una concentración de 1 mg/ml PBS, se incubaron a 37 °C 30 min, y por último se añadió el fluorocromo intercalante yoduro de propidio (YP), a una concentración de 4 μ g/ml H_2O_d para teñir el ADN celular. Un total de 30.000 células de cada muestra se analizó en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan. La distribución del ciclo celular se determinó usando los programas informáticos Cell Fit/ LYSYS TM II. El citómetro diferencia células en las fases G2-M, G1 y S del ciclo celular en base al contenido en ADN, que está en relación directa con la cantidad de fluorescencia emitida por la célula, ya que, como hemos señalado, el YP se intercala en el ADN.

2.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD RELATIVA DE TOPOISOMERASAS I Y II TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE

2.3.1 Sincronización y tratamiento

Para la obtención de proteínas nucleares se obtuvieron primero cultivos celulares sincrónicos en la fase G1 del ciclo celular (apartado 2.2).

En las líneas celulares AA8/EM9 y CHO K1/xrs-5, tras recoger, lavar abundantemente y sembrar las células mitóticas (recogidas por “shake-off”) tuvimos que esperar el tiempo necesario para que la mayoría de la población se encontrara en la fase G1, tiempo determinado anteriormente por el análisis de citometría de flujo y que fue de 3h para las AA8 y 4h para el resto de las líneas.

A diferencia de éstas, las células V79/irs2 sincronizadas en G1 por confluencia se repartieron en varios frascos, y se esperó 1 h para iniciar el tratamiento.

Una vez obtenidos los cultivos sincronizados en G1 para cada una de las líneas, las células se sometieron al tratamiento con una dosis de 5 Gy de rayos X y tras incubar durante 15 min y 1 h, se procedió a la extracción de las proteínas nucleares para el análisis de las actividades Topoisomerasas. Paralelamente se realizaron los extractos nucleares a partir de células en G1 no irradiadas (controles) y a esos mismos tiempos, con el fin de comparar las posibles diferencias entre irradiadas y no irradiadas.

Para la irradiación de células, tanto en este experimento como en experimentos que describiremos posteriormente, se utilizó un tubo de rayos X, Philips MG 103/2.25, a 100 V y una tasa de dosis de 1.6 cGy/sg.

2.3.2 Extracción de proteínas nucleares

El procedimiento seguido para la obtención de extractos nucleares proteicos es básicamente el descrito por Heartlein y col. (1987). Tras recoger las células de los frascos de cultivo (75 cm²) con un rascador, se centrifugaron a 1000 rpm 6 min y se lavaron con PBS 1X. Se volvieron a centrifugar, y tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 ml de tampón A (Sacarosa 0.32 M, Tris-ClH 0.01 M pH 7.5, Cl₂Mg 0.05 M, Tritón X-100 al 1%), se agitaron enérgicamente para lisar las membranas y se obtuvo un pellet de núcleos mediante centrifugación a 2000 rpm, 5 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada con un rotor para eppendorfs. A continuación se eliminó el sobrenadante y se lavaron los núcleos en 1 ml de tampón B (tampón Sörensen 5 mM pH 7, β-mercaptoetanol 1 mM, Ditiotretitol (DTT) 0.5 mM, Fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) 0.1 mM). Los núcleos se volvieron a centrifugar al igual que antes, se resuspendieron en 50 µl de tampón B más 50 µl de tampón C (EDTA 4 mM) y se incubaron a 0 °C durante 15 min. A continuación los núcleos se lisaron mediante la adición de 100 µl de tampón de lisis D (Tris-ClH 20 mM pH 7.5, ClNa 2 M, β-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM) y se realizó una nueva incubación a 0 °C durante 15 min. Tras añadir 50 µl del tampón E

(Polietilenglicol (PEG-6000) al 18%, Tris-ClH 50 mM pH 7.5, ClNa 1 M, β -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM) se llevó a cabo otra incubación a 0 °C durante 40 min. La suspensión celular fue entonces centrifugada a 12.500 rpm durante 30 min a 4 °C, quedando las proteínas nucleares en el sobrenadante. La concentración total de proteína nuclear se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-64 mediante el método de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Para ello, se incubaron durante 15 min y a temperatura ambiente 10 μ l del extracto nuclear con 40 μ l de H₂O_d y 950 μ l del colorante diluido (dilución 0.2:1 en H₂O_d). Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (ASB), con la que se elaboraron las correspondientes rectas de calibración. Los extractos se mantuvieron a -80 °C para el análisis de las actividades Topoisomerasas durante un tiempo máximo de un mes.

2.3.3 Ensayo para la determinación de la actividad Topoisomerasa

La actividad relativa Topo I y Topo II existente en los extractos nucleares se ensayó utilizando los correspondientes kits (TopoGen, Columbus, OH, USA). El ensayo está basado en la capacidad específica de la Topo II para desencadenar ADN de doble cadena de cinetoplasto encadenado, en presencia de ATP, y en la capacidad de la Topo I para relajar ADN plasmídico superenrollado en ausencia de ATP.

La mezcla de reacción para detectar la actividad de Topo II consistió en: 0.4 μ g de ADN encadenado de cinetoplasto (ADN mitocondrial) de tripanosoma (*Crithidia fasciculata*), 2 μ l de tampón de reacción 10X para Topo II (suministrados en el kit), ATP 10 mM, 100 ng de nuestro extracto proteico nuclear y H₂O_d hasta un volumen total de 20 μ l, que se incubó a 37 °C durante 40 min. La mezcla de reacción para la Topo I consistió en 0.4 μ g de un plásmido de ADN superenrollado (pRYG), 2 μ l de tampón de reacción 10X para Topo I (suministrados en el kit), 100 ng del extracto proteico nuclear y H₂O_d hasta un volumen final de 20 μ l que se incubó a 37 °C durante 30 min. Al final de la incubación la reacción se detuvo con tampón de parada específico de Topo I ó II (suministrados en el Kit). Los productos de la reacción se resolvieron en geles de agarosa al 1% en el tampón de electroforesis TAE 1X y estuvieron sujetos a electroforesis 2.5 h a 7 voltios/cm para estudiar la actividad relativa de Topo II y 3.5 h a 3.5 voltios/cm para la Topo I.

Los marcadores para la Topo I fueron el mismo plásmido de ADN que había sido utilizado en la mezcla de reacción en estado superenrollado y con distintos grados de relajación. Para la Topo II se utilizaron como marcadores el mismo ADN de cinetoplasto

que había sido utilizado en la mezcla de reacción en estado lineal, encadenado y desencadenado (todos los marcadores fueron suministrados en el kit de TopoGen) (figura 23).

Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 min, se destiñeron en H_2O_d durante 30 min y finalmente se fotografiaron (Polaroid) bajo iluminación con luz u.v. de longitud de onda corta.

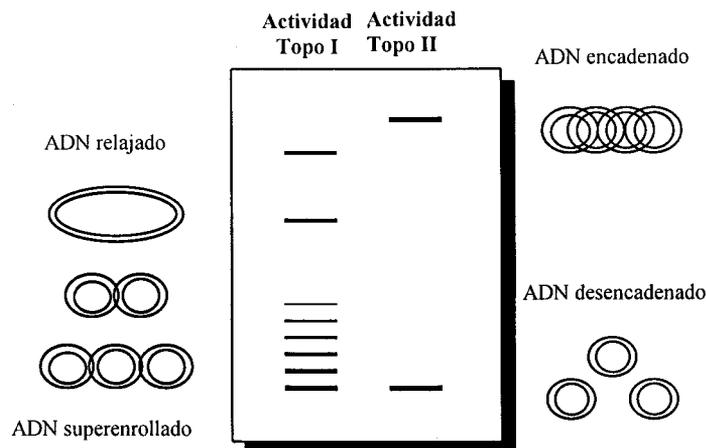


Figura 23. Representación esquemática de las principales bandas obtenidas en los ensayos de actividad relativa de la Topo I y II de eucariotas.

2.3.4 Determinación de la cantidad relativa de enzima Topoisomerasa

2.3.4.1 Análisis inmunocitoquímico

Se utilizaron multipocillos de 12 (Nunc), en cada uno de los cuales se depositó un cubreobjetos circular (Marienfeld 12 mm \varnothing) previamente esterilizado. Para cada línea se sembraron un total de 300.000 células en cada pocillo y esperamos a que las células se adhiresen al sustrato antes de iniciar el tratamiento. Las células se irradiaron con una dosis de 5 Gy de rayos X y se incubaron durante 15 min o 1 h, antes de examinar una posible variación en la cantidad de enzimas Topoisomerasas I y II. Inmediatamente después de estos tiempos, tanto las células irradiadas como otras células controles (también crecidas sobre cubreobjetos) se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS, a pH 7.4 durante 30 min a t^a ambiente, o toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. A continuación, las células se lavaron varias veces con PBS 1X, para eliminar bien los restos de fijador antes de permeabilizar las células, sumergiéndolas en una solución de PBS 1X que contenía saponina (0.05%) y ASB (0.5%) en la que se incubaron durante 20 min (cambiando al

menos 1 vez la solución) a temperatura ambiente. Tras este paso, las células se incubaron en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C con una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal anti-Topo I o anti-Topo II α (TopoGen, Columbus, OH, USA) en la misma solución permeabilizadora. El anticuerpo se lavó con la misma solución anterior, varias veces, antes de incubar las células en una dilución 1:2.500 del anticuerpo secundario anti-Ig G de humanos-HRP para Topo I (Sigma) o anti-Ig G de conejo-HRP para Topo II (Amersham), durante 1 h, a 37 °C. Posteriormente las células se lavaron varias veces en PBS 1X y una vez, 2 min, en una solución Tris-ClH (0.05 M) pH 7.4.

Para el revelado de la peroxidasa se preparó una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.02% en la solución de Tris-ClH anterior, ajustando el pH final a 7. Justo antes de usarla se añadió 100 μ l de H₂O₂ al 1%. Las células se cubrieron con esta solución recién preparada y se dejaron reaccionar entre 10-20 min, en oscuridad y a temperatura ambiente, a continuación la DAB se lavó con Tris-ClH y H₂O_d y se dejaron secar a temperatura ambiente antes de montar los cubres con DPX (Fluka).

Las preparaciones se visualizaron al microscopio óptico y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS Vanox AHBT3.

2.3.4.2 Inmunotransferencia o Western blot

Partiendo de frascos de cultivo de 75 cm² con células en crecimiento exponencial, en primer lugar se realizaron los extractos de proteínas celulares totales 15 min y 1 h después del tratamiento con una dosis de 5 Gy de rayos X. Igualmente se realizó el mismo protocolo en células controles y a los mismos tiempos anteriores. Para ello se lavó el medio con PBS 1X frío, separamos las células del frasco con rascadores y las centrifugamos a 1.000 rpm 6 min, en una centrífuga refrigerada a 4 °C. El pellet se resuspendió en 250 μ l del buffer de lisis (Tris-ClH 5 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 0.5%, pH 8), que contenía los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM), aprotinina A (10 μ g/ml) y leupeptina (10 μ g/ml). Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min y tras pasar el contenido celular por una jeringuilla para completar la lisis, los eppendorfs se centrifugaron a 15.000 rpm 30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración total de proteína celular mediante el método de Bio-Rad (ver apartado 2.3.2). Los extractos nucleares se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), transferencia a membranas de PVDF y revelado mediante ECL.

A continuación las proteínas se mezclaron con sample buffer 2X (Tris 0.125 M, Glicerol 20%, SDS 4.6%, DTT 10 mM, azul de bromofenol 0.2%, pH 6,8), se calentaron durante 5 min a 90 °C y las proteínas liberadas se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE según Laemmli (Laemmli, 1970). Utilizamos 30 µg de proteína celular total para la Topo I y II. Se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 7.5 % para la Topo I y del 5% para la Topo II y en ambos casos de un grosor de 75 mm. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 8 proteínas preteñidas cuyos pesos moleculares oscilaban entre 6.9 y 205 KDa (Broad Range, BioRad).

La transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (di-fluoruro de polivinilideno, Millipore) se realizó según el método de Towbin (Towbin y col., 1979) en presencia de solución de transferencia, activando previamente el PVDF con metanol. El sistema utilizado fue el de transferencia húmeda (BioRad) ajustando el voltaje y el tiempo en función del peso molecular de la proteína, que en estos casos fueron de 30 V 45 min para la Topo I y de 60 V 1 h para la Topo II.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se incubaron durante al menos 1 h con tampón bloqueante preparado con leche en polvo al 5% en TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, 0.1% Tween-20, pH 7.6). Después de lavar varias veces con tampón TBS pH 7.6 (tampón de lavado), las membranas se incubaron durante 1 h a 37 °C con una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-Topo II o anti-Topo I preparado en el buffer de bloqueo. Tras lavar abundantemente con el tampón de lavado, las membranas se incubaron de la misma forma en una dilución 1:2500 del anticuerpo secundario anti-IgG de humanos-HRP para Topo I o anti-IgG de conejo-HRP para Topo II preparado igualmente en buffer de bloqueo. Las membranas se lavaron abundantemente con el mismo buffer de lavado y se procedió al revelado de la actividad peroxidasa mediante un ensayo de quimioluminiscencia (SuperSignal Ultra Chemiluminescent Substrates, Pierce, USA) basado en la detección de antígenos específicos mediante anticuerpos marcados con peroxidasa a través de la emisión de luz. Elegimos este método para detectar las proteínas fijadas en la membrana de PVDF por presentar una serie de ventajas con respecto a otros métodos de detección tales como: alta sensibilidad, ya que son necesarios tiempos de exposición muy cortos (desde pocos segundos a 1 hora) para obtener resultados altamente resolutivos; el ser un método no radiactivo, evitándose por tanto todos los riesgos que conlleva todo el trabajo con la radiactividad; y el no haber una pérdida de los colores obtenidos durante el revelado, como ocurre con otros sistemas de detección en los que los

colores tienden a perderse con el tiempo y con la exposición a la luz, dificultando la cuantificación de los resultados.

Las membranas así tratadas fueron utilizadas para impresionar películas fotográficas de alta sensibilidad (Pierce). Las membranas se revelaron, se escanearon y las bandas se cuantificaron utilizando el programa de análisis de imágenes PCBAS versión 2.08.

2.4 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA II, BUFALIN E ICRF-193

2.4.1 Ensayos de citotoxicidad

Se utilizó la técnica de la sulforrodamina B (SRB) (Skehan y col., 1990) para testar la citotoxicidad de los inhibidores de Topoisomerasa II utilizados en este trabajo.

Los inhibidores de Topo II bufalin (Sigma, USA) e ICRF-193 (Biomol, Hamburg) se disolvieron inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO), según las indicaciones de la casa comercial, quedando a unas concentraciones stock de 5 mM y de 1 mM respectivamente. Las diluciones posteriores se prepararon en medio a partir de las soluciones madres.

Se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc) en las cuales se sembraron células de AA8 y EM9 a una concentración de 5×10^3 células en un volumen de 100 μ l de medio de cultivo para cada pocillo y se dejaron crecer durante 24 h. Tras este período de recuperación, se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones del inhibidor de Topo II deseado disuelto en 100 μ l más de medio. Las dosis empleadas fueron 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, y 500 μ M para el bufalin y de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 25 μ M para el ICRF-193. Las células se incubaron en presencia del compuesto durante 48 h y a continuación se las sometió a los procesos de fijación y tinción. Para precipitar las proteínas y fijar las células se adicionó a cada pocillo 50 μ l de ácido Tricloroacético (TCA) frío al 50% en H_2O_d y se incubaron las células durante 1 h a 4 °C. A partir de este momento las placas se lavaron 5 veces con H_2O_d y se las dejó secar al aire. A continuación las células se tiñeron adicionando a cada pocillo 100 μ l de SRB al 0.4% (p/v en acético al 1%) y después de 30 min a temperatura ambiente las placas se lavaron 5 veces con ácido acético al 1% y se dejaron secar. Finalmente, para solubilizar las proteínas teñidas, se adicionó 100 μ l de Tris-Base 10 mM a cada pocillo, las placas se agitaron durante 5 min y se leyeron las densidades ópticas a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro automático de placa (lector ELISA, Labsystems Multiskan MS).

2.4.2 Estudio de la inhibición de la actividad Topo II

Los inhibidores de Topoisomerasa II se adicionaron a los frascos de cultivo (de 75 cm²) (estudio *in vivo*) de las líneas AA8 y EM9, cuando las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial, quedando a unas concentraciones finales de 1, 10, 100 y 500 μM para el bufalin y de 2, 5, 10, y 25 μM para el ICRF-193. Las células se incubaron durante 22 h en presencia del inhibidor y a continuación se procedió a la extracción de las proteínas nucleares (apartado 2.3.2) y al ensayo para la determinación de la actividad Topo II (apartado 2.3.3), con el fin de comprobar el grado de inhibición que estos compuestos ejercían sobre la enzima. De forma paralela se obtuvieron extractos nucleares en células controles para poder realizar posteriormente un estudio comparativo y observar diferencias si las hubiera.

En este caso, y a pesar de haber realizado los ensayos para la determinación de la actividad Topo II *in vivo* (como se ha descrito anteriormente), se decidió hacer también, y de forma excepcional, *in vitro*, para observar alguna diferencia si la hubiera, y poder atribuirle a una diferencia en los mecanismos de acción de estos dos compuestos. Para ello se realizaron las extracciones de proteínas nucleares totales exclusivamente en células controles (no tratadas con estos compuestos) de AA8 y EM9, y en el momento de realizar los ensayos de actividad se mezclaron en 20 μl de volumen final, 100 ng de proteína nuclear total más el compuesto (bufalin o ICRF-193) a las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos *in vivo*; a dicha mezcla de reacción se añadió las mismas concentraciones que siempre de ADN encadenado, buffer de reacción 10X, ATP y se completó con H₂O_d hasta un volumen final de 20 μl . Estas muestras se incubaron durante 1 h a 37°C, y a partir de este momento todo se realizó de la forma habitual.

2.4.3 Análisis de producción de aberraciones cromosómicas

Uno de los efectos citológicos más claros de los distintos agentes mutagénicos es la producción de daño en los cromosomas. Las roturas en el ADN pueden dar lugar a alteraciones estructurales en los cromosomas, denominadas aberraciones cromosómicas. Las aberraciones cromosómicas pueden clasificarse en aberraciones de tipo cromatídico o cromosómico, según afecten a una sola cromátida o a ambas (al mismo nivel) en el cromosoma, lo cual depende del tipo de daño inducido y la fase del ciclo en que ha tenido lugar. Así, los agentes se pueden clasificar, según el tipo de lesión que produzcan, en S-dependientes o S-independientes. Los primeros, como la luz UV y la mayoría de los

mutágenos químicos, inducen lesiones que han de pasar por una fase S para poder ser visualizadas como aberraciones de tipo cromatídico. Los agentes S-independientes, como los rayos X y compuestos radiomiméticos, por el contrario, producen aberraciones cromatídicas cuando se exponen las células en la fase G₂, aberraciones de tipo cromosómico en G₀ o G₁ y ambos tipos de aberraciones en la fase S, dependiendo de si la zona implicada se ha replicado o no al producirse la lesión en el ADN (figura 24).

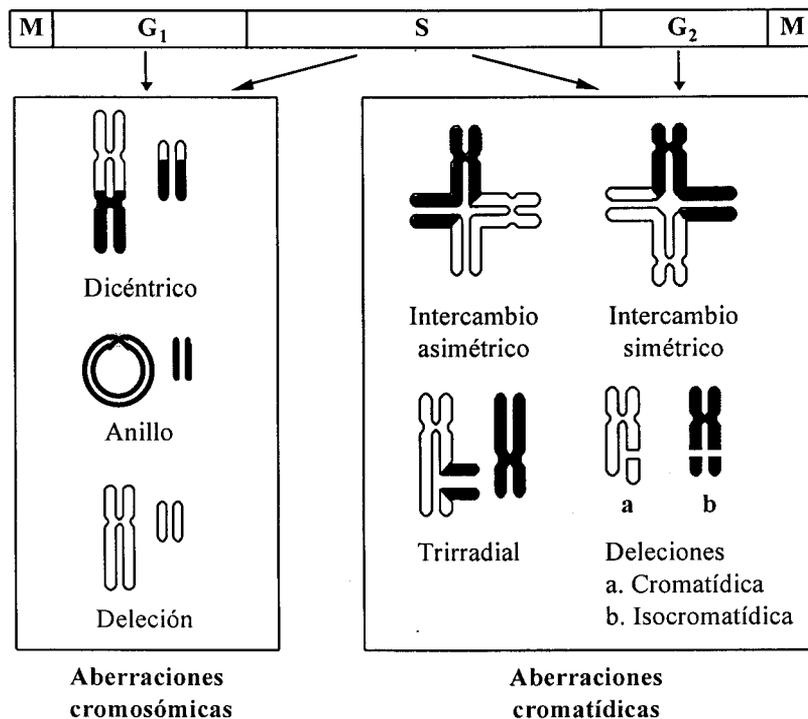


Figura 24. Tipos de aberraciones observadas en este trabajo.

La producción final de aberraciones cromosómicas resulta del balance del daño inducido y de la eficacia y exactitud en la reparación de las lesiones. La reparación puede reconstruir la configuración original del cromosoma (restitución), puede provocar la unión entre extremos ilegítimos (aberraciones de tipo intercambio) o puede dar lugar a deleciones al quedarse la rotura abierta.

Para llevar a cabo este estudio, las líneas celulares AA8 y EM9 (en frascos de 75 cm²) se sometieron al tratamiento con los inhibidores de Topoisomerasa II de la siguiente manera:

Para el bufalin, las células se cultivaron en presencia del inhibidor durante 22 h utilizando unas concentraciones de 1, 10, 100 y 500 μM. A continuación se realizaron dos variantes, por una parte las células se lavaron con medio fresco y se dejaron recuperar

durante 5 h antes de la adición de Colcemida, y por otra parte el mismo experimento se realizó sin dejar tiempo de recuperación, añadiendo Colcemida al medio después de que se completasen las 22 h de tratamiento.

Para el ICRF-193, las células se cultivaron durante 22 h en presencia del inhibidor, quedando a unas concentraciones en el medio de 10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 5×10^{-2} y $0,1 \mu\text{M}$. En este caso se dejaron recuperar las células durante 5 h en medio fresco para permitir que las células alcanzasen la fase de mitosis.

Para poder recoger suficientes células metafásicas se adicionó al medio Colcemida 2×10^{-7} M, para bloquear las células en metafase y después de 3 h se recogieron mediante agitación ("shake-off"). Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 6 min y el precipitado celular se resuspendió suavemente en una solución hipotónica de ClK 0.075 M a 37°C , en la que se mantuvieron sólo 2 min con el fin de que el choque hipotónico actuase de la forma deseada. Al igual que antes, las células se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en una solución fijadora de metanol:acético glacial recién preparada (3:1 v/v) y se volvieron a centrifugar. Este paso de fijación se repitió una segunda vez. En cada uno de los casos manteníamos frascos de células no tratadas (controles) que se procesaron de forma paralela al resto de los frascos de células tratadas.

Las preparaciones se obtuvieron tomando algunas gotas de la suspensión de células fijadas y vertiéndolas sobre portaobjetos. Estas preparaciones se tiñeron con Giemsa al 3% en tampón Sörensen a pH 6.8 durante 6 min. A continuación se lavaron muy bien con H_2O_d y se dejaron secar bien. El último paso antes del conteo de las aberraciones consistió en el montaje, para el cual las preparaciones se pasaron dos veces por Xilol y se montaron con DPX. Para cada tratamiento, al igual que para las células controles, se analizaron al microscopio un total de 100 metafases, en las que se diferenció cada tipo de aberración para establecer la clasificación correspondiente.

2.4.4 Producción de células endorreduplicadas

Para obtener células endorreduplicadas se probaron distintos tiempos de tratamiento y de recuperación, siendo el protocolo detallado a continuación el que nos dio mejores resultados.

Células en crecimiento exponencial (frascos de 75 cm^2) se mantuvieron en presencia de los inhibidores de Topo II a una concentración final de 1, 50, 100, y $500 \mu\text{M}$, durante 22 h para el bufalin y de 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, y $1 \mu\text{M}$, durante 3 h para el ICRF-193. A partir de este momento los cultivos se lavaron bien para eliminar el

tratamiento y se mantuvieron en medio fresco durante un tiempo de recuperación de 5 h para el bufalin y de 18 h para el ICRF-193. Con el fin de obtener un buen número de células mitóticas, las células se mantuvieron 3 h más en presencia de colcemida (2×10^{-7} M). Paralelamente, llevamos a cabo cultivos controles sin tratar con inhibidores.

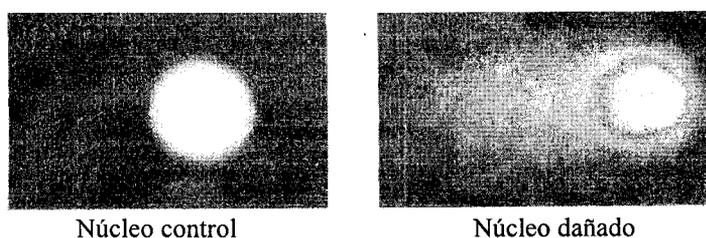
El protocolo de obtención de las células mitóticas fue similar al descrito anteriormente (apartado 2.4.3).

Para comprobar si 3h de tratamiento eran suficientes para inhibir la actividad catalítica Topo II, las células se incubaron durante ese período de tiempo en presencia del compuesto, utilizando las mismas concentraciones que se usaron para la obtención de células endorreduplicadas, e inmediatamente después se llevaron a cabo la extracción de proteínas nucleares y los ensayos de actividad Topo II, de la misma forma que se explicó en los apartados 2.3.2. y 2.3.3.

2.4.5 Cuantificación del daño en el ADN, producido por bufalin e ICRF-193, mediante la electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo del cometa”

El SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) o “ensayo del cometa” es un método rápido, sensible y fácilmente reproducible para determinar las roturas inducidas en el ADN por distintos agentes mutagénicos en células eucarióticas (Fairbairn y col., 1995). La ventaja principal de este método es que no se necesita un número alto de células para realizarlo y es un ensayo muy útil para trabajar con células quiescentes de diferentes tejidos, ya que no requiere células proliferativas para poder observar el daño.

Desde que la técnica fue descrita por primera vez por Östling y Johanson en 1984, han surgido muchas modificaciones y actualmente el protocolo más utilizado fue el descrito por Singh y colaboradores en 1988, en el que las células son sometidas a unas condiciones alcalinas de lisis y electroforesis de manera que este ensayo nos permite detectar las roturas de doble cadena, de cadena simple, así como los sitios lábiles a álcali. De esta forma, en las células controles (sin daño) visualizaremos al microscopio de fluorescencia los núcleos redondos y en las células con el ADN dañado, aparecerá una migración de los fragmentos de ADN produciendo lo que se conoce como la cola del cometa (**Fig**). Esta migración del ADN, y en definitiva la cola del cometa, está en función del tamaño de los fragmentos de ADN y del número de éstos.



Núcleo control

Núcleo dañado

Figura 25. Aspecto de los núcleos tras el ensayo del cometa. Tras la lisis celular y la electroforesis los núcleos control tienen un aspecto redondeado, mientras que los dañados adquieren la forma de un cometa, ya que los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo.

Para estudiar el posible daño genético inducido por estos inhibidores, las células se mantuvieron en presencia de bufalin a unas concentraciones finales de 1, 10, 100 y 500 μM , durante 22 h. Para el tratamiento con el ICRF-193 las concentraciones utilizadas fueron de 2, 5, 10 y 25 μM , durante un período de 3 h.

A partir de este momento se procedió a realizar el ensayo del cometa, para lo cual se recogieron las células con rascador y se resuspendieron en un volumen de PBS quedando a una concentración de 10^6 células/ml. En todo momento se cuidó especialmente el mantener las células en hielo, una vez cumplidos los tiempos de tratamiento, además de las soluciones frías, con el fin de que el daño producido no se reparase. El protocolo del cometa que realizamos en este trabajo ha sido básicamente el descrito por Singh y col. (1988) con algunas modificaciones.

Para la realización del ensayo preparamos la primera capa de agarosa al menos un día antes de llevar a cabo el experimento. Ésta consistió en agarosa normal al 1% (FMC) en H_2O_d que se calentó hasta alcanzar aproximadamente los 55 $^\circ\text{C}$, dentro de la cual se introdujeron portaobjetos en vertical, con un extremo esmerilado para evitar el desprendimiento de dicha capa. Éstos se dejaron secar y se guardaron a 4 $^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Para la preparación de la segunda capa se preparó agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 0.7% en PBS y se mantuvo a una temperatura de 37 $^\circ\text{C}$ para su uso. Sobre la primera capa de agarosa, se añadieron 60 μl de agarosa de bajo punto de fusión y 20 μl de la suspensión celular, se colocó un cubreobjetos con cuidado y se dejó gelificar unos 5 min a 4 $^\circ\text{C}$.

Transcurrido este tiempo, y después de retirar el cubreobjetos, se cubrió la segunda capa con 80 μl de agarosa de bajo punto de fusión a 37 $^\circ\text{C}$ y, tras poner otro cubreobjetos, los portas se colocaron de nuevo a 4 $^\circ\text{C}$ durante 5 min.

Una vez gelificada la tercera capa de agarosa, los portas se sumergieron en una solución de lisis de membranas, previamente refrigerada, de pH 13. Esta solución está

formada por un tampón de lisis (CINa 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris-ClH 10 mM, N-Laurosilsarcosinato 0.77% p/v, NaOH 0.25 M, pH 10) al que se añadió 10% (v/v) de DMSO y 1% (v/v) de Tritón X-100 (Fluka) en el momento de utilizarla. Los portaobjetos se mantuvieron en esta solución a 4 °C y en oscuridad durante 1 h.

Tras la lisis celular, los portas se colocaron sobre una cubeta horizontal de electroforesis que se llenó con tampón electroforético recién preparado y frío (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>12). Los portaobjetos se dejaron en el tampón durante 20 min para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, que se realizó a 4 °C durante 20 min a 1.6 V/ cm y 300 mA.

Una vez terminada la electroforesis los portaobjetos se lavaron varias veces con tampón de neutralización frío (Tris-ClH 0.4 M, pH 7.5) durante 5 min para eliminar las sales y detergentes que podrían interferir con la tinción posterior. Para la tinción se añadió 50 µl de DAPI (5 µg/ml) preparado en Vectashield (medio de montaje que preserva la fluorescencia, laboratorios Vector, Burlingame, USA) a una concentración de 5 µg/ml.

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia OLYMPUS Vanox AHBT3 y se captaron (usando el objetivo de 20X) imágenes de 50 células escogidas aleatoriamente en cada tratamiento, que se analizaron posteriormente mediante el programa CASys (Synoptics, Ltd, image processing systems, UK)

Como parámetro para analizar el nivel de daño en el ADN se empleó el momento de los cometas, definido como el producto del porcentaje de ADN presente en la cola por la longitud de la misma (Singh y col., 1988).

2.5 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y REPARACIÓN DEL MISMO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL INHIBIDOR DE TOPO II BUFALIN

2.5.1 Estudio dosimétrico del daño a tiempo 0h.

Para estudiar el daño genético inducido por la radiación ionizante inicialmente, en ausencia de reparación, y establecer una curva de dosimetría se empleó el SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) o “ensayo del cometa”. Para ello las células se irradiaron en hielo con un rango de dosis de 3 a 7 Gy para la línea AA8 y de 2 a 6 Gy para las EM9 (la diferencia de dosis se debe a la mayor radiosensibilidad de estas últimas) e inmediatamente se procedió a la realización del “ensayo del cometa” (apartado 2.4.5), manteniendo siempre en hielo las células y con todas las soluciones frías, con el fin de evitar la reparación.

2.5.2 Reparación del daño inducido por la radiación ionizante

A diferencia del apartado anterior, en este caso sí permitimos que las células tuviesen la oportunidad de reparar el daño producido por los rayos X, manteniéndolas en el incubador a 37 °C después de irradiar con la dosis elegida de 4 Gy para la línea AA8 y de 3 Gy para la línea radiosensible EM9. Los tiempos de reparación fijados fueron de 15, 30, 45 min, 1, 2 y 3 h, después de irradiar. También se llevaron en paralelo un frasco de cultivo en el que se examinó el daño inicial (0 h) y otro frasco control (sin irradiar).

Cumplidos estos tiempos, las células se procesaron para la realización del ensayo del cometa (apartado 2.4.5).

2.5.3 Modulación de la reparación tras el tratamiento combinado de rayos X con el inhibidor bufalin

Nuestro objetivo consistía en ver si la inhibición de la Topoisomerasa II, en base a la posible implicación de dicha enzima en la reparación del daño en el ADN, modificaba de alguna forma la reparación del daño inducido por la radiación ionizante. Para ello utilizamos nuevamente el ensayo del cometa.

Con esta finalidad las células de AA8 y EM9 se incubaron durante 22 h en presencia de una concentración de 5×10^{-4} M de bufalin (anteriormente se comprobó que esta concentración y este período de tratamiento provocaba la inhibición de la actividad Topo II, y que se puede observar en la figura 38A y B). Transcurrido este tiempo y en presencia del inhibidor las células se irradiaron con 5 Gy (para las AA8) o de 4 Gy (para las EM9) (al igual que en el apartado 2.5.2). A partir de este momento se permitió que las células reparasen incubando los frascos de cultivo a 37 °C durante distintos intervalos de tiempo, al igual que en el apartado anterior, desde 15 min hasta un máximo de 3 h. Transcurridos estos tiempos las células se colocaron en hielo y se llevó a cabo el ensayo del cometa (apartado 2.4.5). Igualmente se procesaron células a tiempo 0h (en ausencia de reparación) y células controles.

2.5.4 Cuantificación de daño inicial mediante electroforesis de campo pulsante

Se llevó a cabo la electroforesis de campo pulsante para cuantificar el daño inicial producido por rayos X en presencia y ausencia del solvente DMSO, medio recomendado por el proveedor en el que se disuelve el bufalin, con la finalidad de comprobar el efecto radioprotector que este agente posee. De esta forma cultivos de AA8 y EM9 en

crecimiento exponencial se irradiaron con una dosis de 50 Gy en presencia y ausencia de DMSO al 5 y 10 %, manteniendo dicho compuesto en el medio de cultivo durante 22 h antes de irradiar. Tras irradiar en hielo para evitar la reparación, las células se procesaron para realizar la electroforesis de campo pulsante. El método utilizado fue básicamente el descrito por Elia y Bradley (1992) con algunas modificaciones. Así, después de la irradiación las células se tripsinizaron, se lavaron en PBS y se determinó el número de células por ml. Las células se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % en PBS (Bio-Rad), quedando a una concentración final de 4×10^6 células por ml. Los moldes utilizados para formar los “plugs” (Bio-Rad, de 250 μ l) se rellenaron con la suspensión celular y se mantuvo el molde a 4 °C durante 30 min para conseguir que la agarosa gelificara. Transcurrido este tiempo los “plugs” se sumergieron en solución de lisis (EDTA 0.5 M pH 8, N-Laurosilsarcosinato 2% p/v, proteinasa K 0.5 mg/ml) donde se mantuvieron de 18 a 24 h a 37 °C. Posteriormente se preparó el gel de agarosa normal al 0.8 % en TBE 0.5X (Tris-ClH 0.05M, borato 0.05M, EDTA 0.1mM, pH 8.4) y se cargaron las diferentes muestras en los pocillos. La electroforesis de campo pulsante se llevó a cabo en un sistema CHEF-DRII (Bio-Rad), usando el tampón TBE 0.5X, manteniendo su temperatura a 14 °C y empleando unas condiciones de 45 V durante 96 h, con cambio del pulso de corriente cada 60 min. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio a una concentración de 3 μ g/ml durante 5 min, se destiñeron en H₂O_d durante 30 min y finalmente se fotografiaron (Polaroid) bajo iluminación con luz u.v. de longitud de onda corta.

RESULTADOS

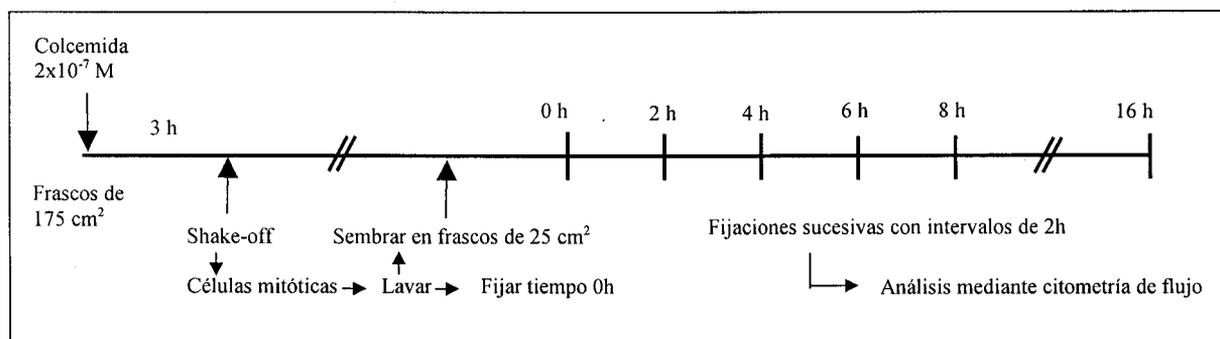
3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Este estudio previo y detallado de la progresión a lo largo del ciclo celular de cada una de las líneas celulares en particular empleadas en este trabajo era necesario con el fin de, posteriormente, poder realizar los distintos tratamientos, en este caso con rayos X, en la fase del ciclo celular deseada.

Con el fin de obtener cultivos sincrónicos y poder conocer el tiempo de permanencia de la población en cada una de las fases del ciclo celular, se llevaron a cabo dos protocolos diferentes de sincronización debido a que las líneas celulares empleadas en el estudio presentaban características diferentes de adherencia al sustrato.

Como ya detallamos en materiales y métodos, los fibroblastos de hámster Chino AA8 (parental)/EM9 (mutante) y CHO K1 (parental)/xrs-5 (mutante) se sincronizaron en mitosis mediante el método de agitación ("shake off") siguiendo el protocolo que se esquematiza a continuación:



Las figuras 26, 27, 28 y 29 muestran la distribución del ciclo celular para las líneas AA8, EM9, CHO K1 y xrs-5, respectivamente. Como se puede observar en dichas figuras, la población de células mitóticas seleccionada por nosotros progresaba de forma sincrónica tras su siembra, a través de las distintas fases de ciclo celular.

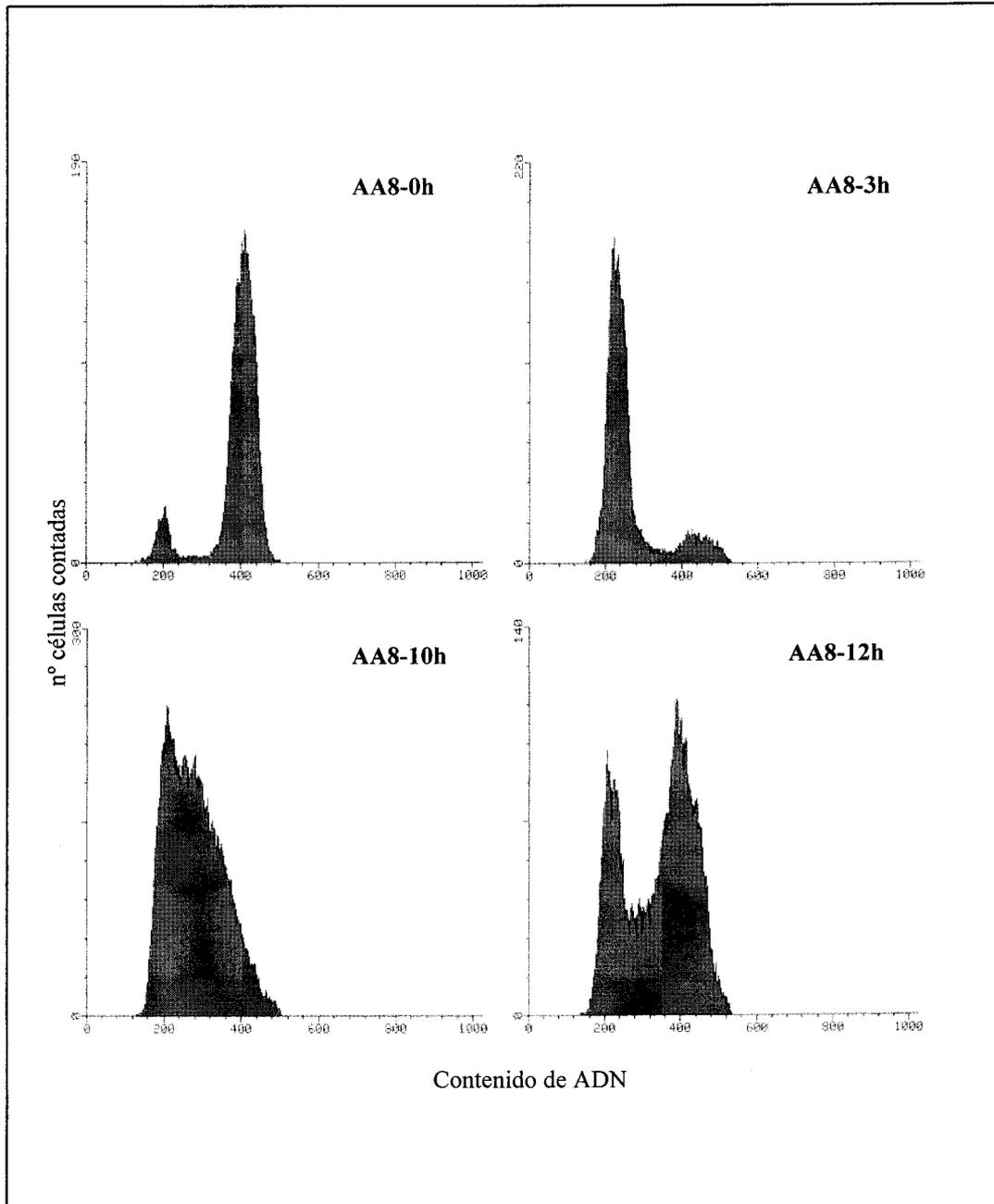


Figura 26. Estudio de citometría de flujo para la línea parental AA8 sincronizada en metafase mediante “shake-off” (0h) y muestreada para analizar su progreso a través del ciclo celular. En cada histograma el pico de la izquierda representa la población celular en G1, en el que el contenido en ADN es 2C; el pico de la derecha corresponde a la población celular en la fase G2/M, contenido en ADN 4C y la población entre las dos fases representa a las células en fase S, transición en el contenido de ADN entre 2C y 4C, ya que en esta fase se replica el ADN.

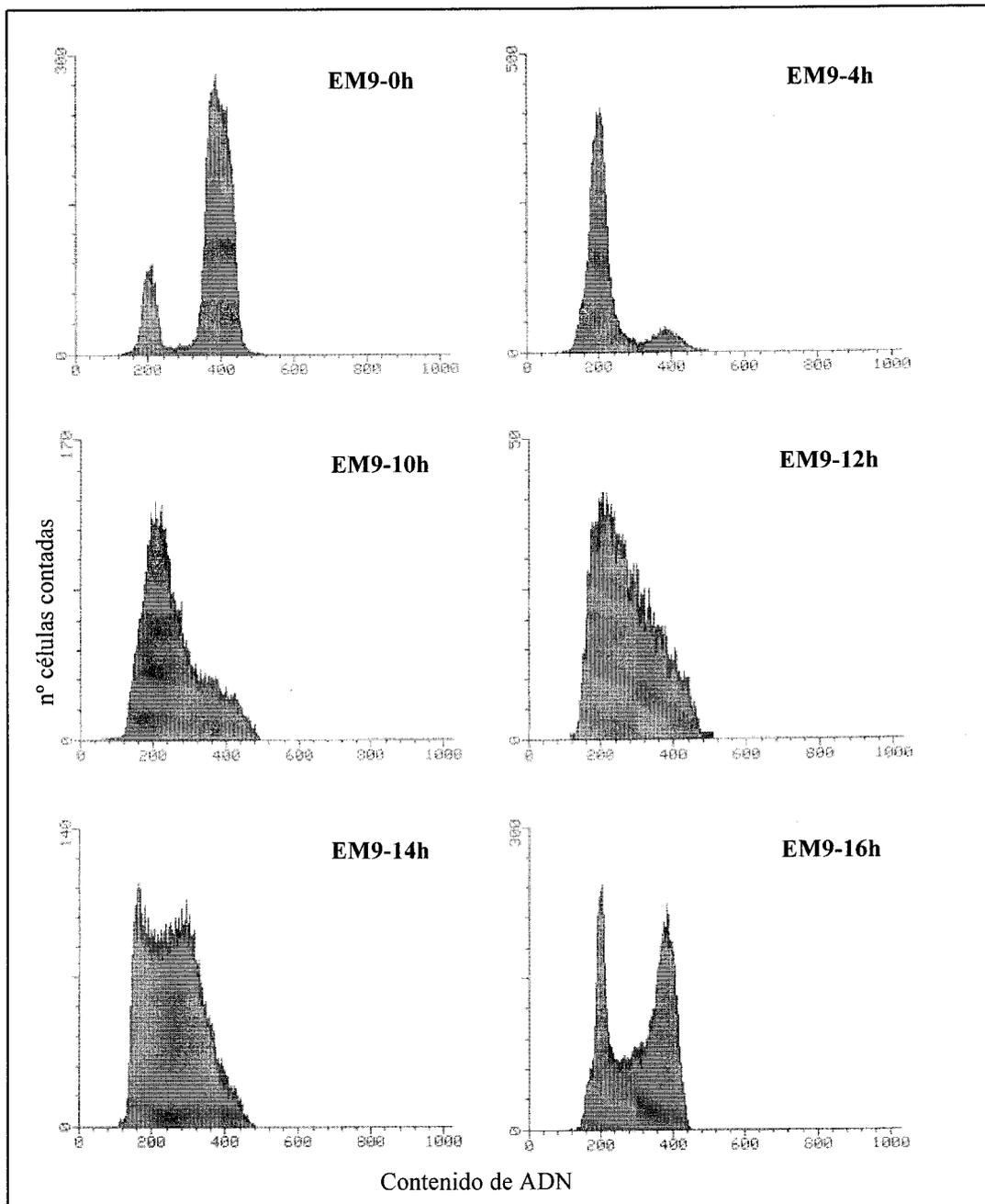


Figura 27 Estudio de citometría de flujo para la línea mutante EM9 sincronizada en metafase mediante “shake-off” (0h) y muestreada para analizar su progreso a través del ciclo celular. Se puede observar como la población mitótica avanza en buena sincronía por las distintas fases del ciclo celular. En este caso y a diferencia de la línea parental, el tiempo de ciclo es de aproximadamente 16h.

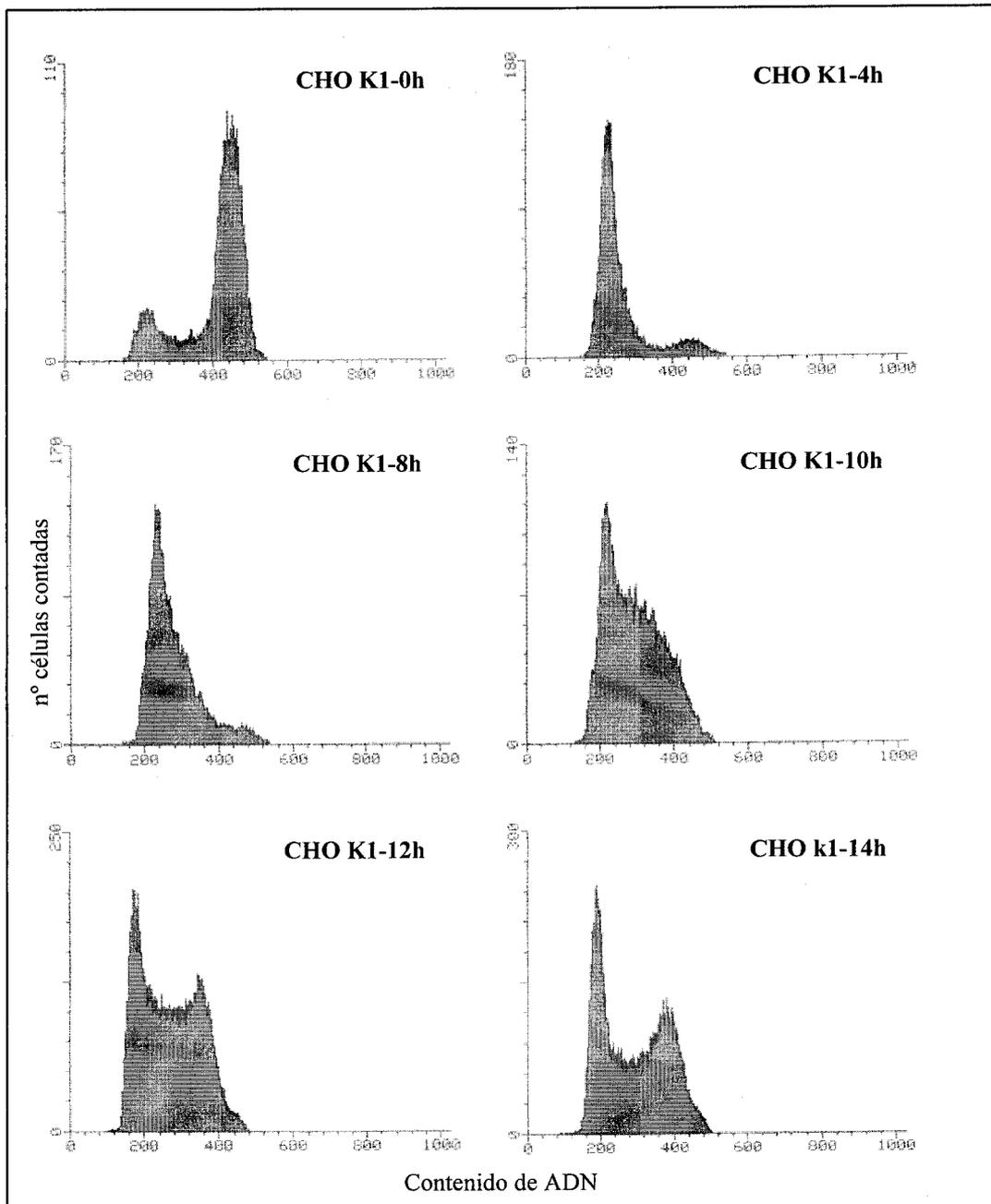


Figura 28. Estudio de citometría de flujo para la línea parental CHO K1 sincronizada en metafase mediante “shake-off” (0h) y muestreada para analizar su progreso a través del ciclo celular 4h, 8h 10h, 12h y 14h después de sembrarlas en medio fresco. Se puede observar como la población mitótica avanza en buena sincronía por las distintas fases del ciclo celular.

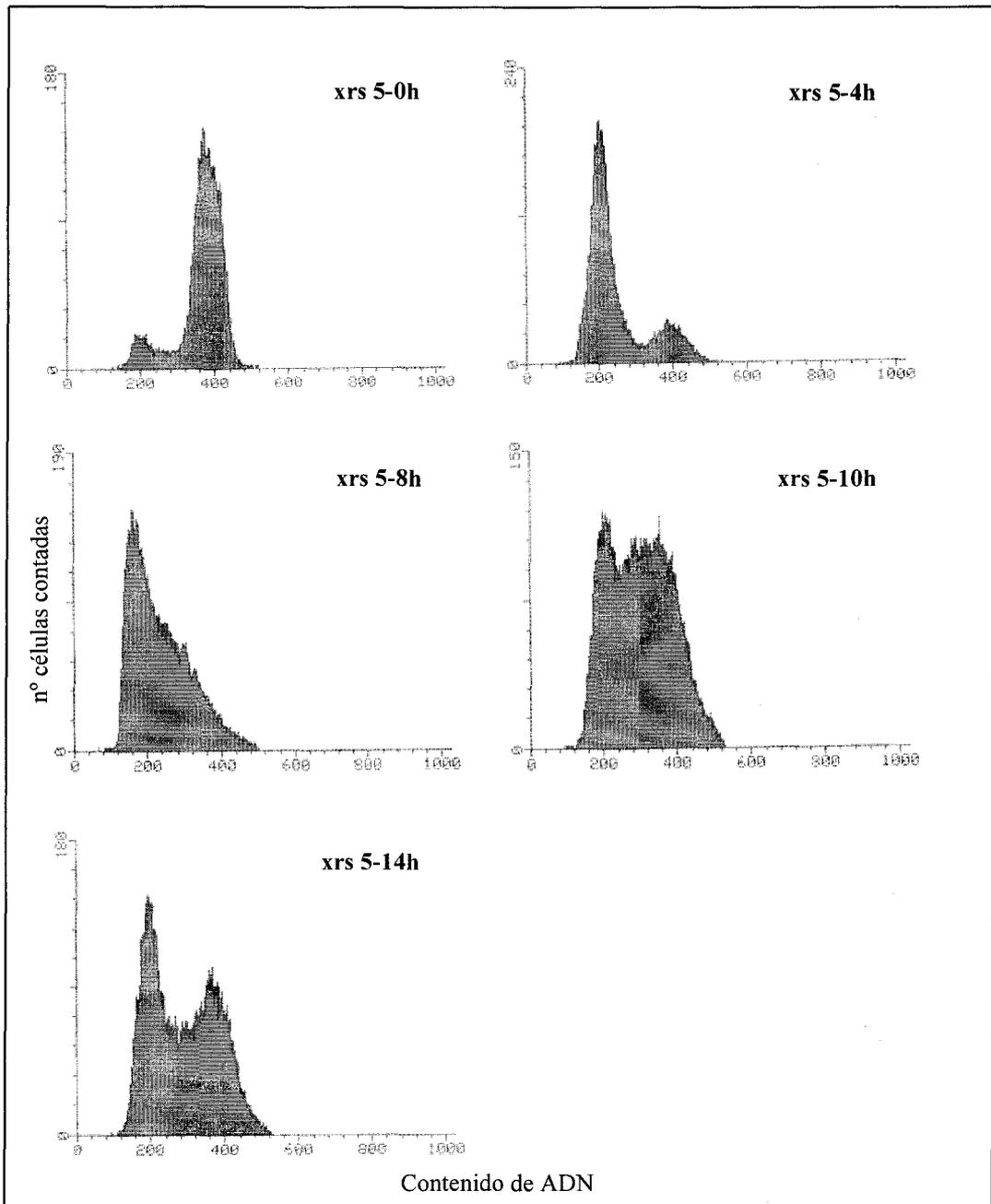


Figura 29. Estudio de citometría de flujo para la línea radiosensible xrs 5 sincronizada en metafase mediante “shake-off” (0h) y muestreada para analizar su progreso a través del ciclo celular 4h, 8h 10h, y 14h después de sembrarlas en medio fresco. Se puede observar como la población mitótica avanza en buena sincronía por las distintas fases del ciclo celular.

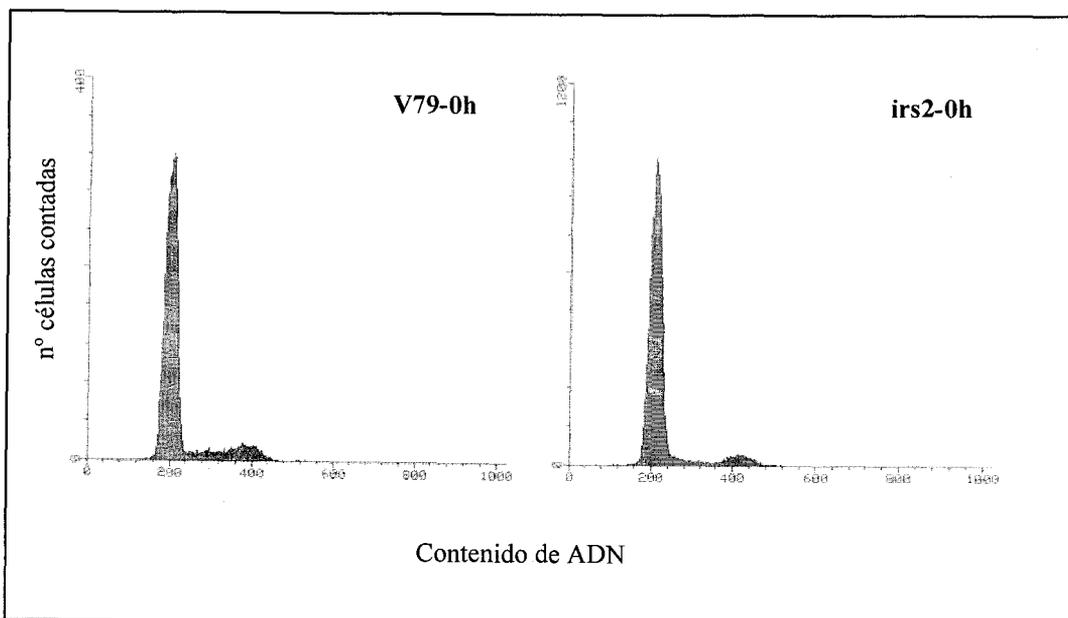
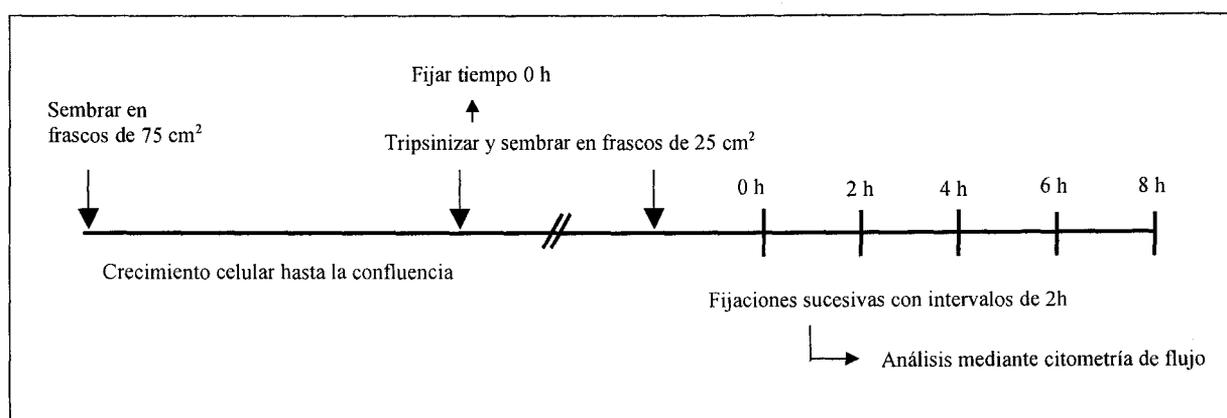


Figura 30. Estudio de citometría de flujo para la línea parental V79 y su correspondiente línea mutante irs2 sincronizadas por confluencia en G1.

Debido a que las líneas celulares V79 (parental)/irs2 (mutante) presentan una elevada adherencia al sustrato, no pudimos sincronizarlas mediante “shake off” como en el caso de las anteriores, por lo que estas células se sincronizaron en la fase G1/Go del ciclo celular, permitiendo que el cultivo alcanzara el estado de confluencia. El protocolo seguido en este caso fue el que se muestra en el esquema siguiente:



En la figura 30 se muestra la casi perfecta sincronización obtenida siguiendo este protocolo, para las líneas celulares V79/irs2, aunque sólo las pudimos sincronizar en la fase de G1-Go del ciclo, ya que una vez el cultivo alcanza el estado de confluencia, las células detienen su progresión a través del ciclo celular y el reiniciar de nuevo dicha

fase de G1-Go del ciclo, ya que una vez el cultivo alcanza el estado de confluencia, las células detienen su progresión a través del ciclo celular y el reiniciar de nuevo dicha progresión no les resulta nada fácil y no toda la población entra en la siguiente fase de forma sincrónica, sino que dicha entrada ocurre de forma escalonada. Debido a ello, en este caso no pudimos obtener células sincronizadas en las fases S y G2 del ciclo celular.

Tras observar los histogramas de citometría de flujo elegimos la fase G1 del ciclo celular para llevar a cabo los experimentos de irradiación por dos razones fundamentalmente. Por una parte, en la fase G1, y antes de que las células entren en la fase S y repliquen su ADN, existen puntos de control importantes, como es bien conocido para la proteína p53, que censan el daño y desencadenan, en último término, la reparación del daño en el ADN o, en el caso de que el daño sea difícil de reparar, la muerte celular por apoptosis. En segundo lugar ésta era la fase del ciclo celular en la que, como hemos podido ver, obteníamos una mejor sincronización de la población para cada una de las líneas.

3.2 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD RELATIVA DE TOPOISOMERASA I Y II TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE

3.2.1 Modulación de la actividad Topoisomerasa I y II tras la irradiación en G1

La actividad relativa de Topo I se midió en términos de su capacidad para relajar ADN superenrollado, y de la Topo II en función de su capacidad de desencadenar ADN de doble hebra de cinetoplasto encadenado en presencia de ATP.

Las células se irradiaron con 5 Gy de rayos X cuando se encontraban en la fase G1 del ciclo celular, y esto correspondía, según los histogramas de citometría de flujo, a 3h después de sembrar las células mitóticas, en el caso de la línea AA8, y a 4h para el resto de las líneas sincronizadas en mitosis (EM9, CHO K1 y xrs-5). En el caso de las líneas celulares sincronizadas en G1-G0 por confluencia (V79 e irs2), los cultivos se tripsinizaron, se repartieron en distintos frascos con medio fresco y 1h más tarde, cuando las células se había adherido al sustrato, se irradiaron igualmente con 5 Gy de rayos X. Transcurridos 15 min ó bien 1 h después de la irradiación se llevó a cabo la extracción de las proteínas nucleares totales, y con estos extractos se ensayó la posible modulación de las actividades Topoisomerasas que pudiera haber existido como consecuencia del tratamiento con 5 Gy de rayos X. De forma paralela, siempre se muestrearon y analizaron células control no irradiadas para poder realizar estudios comparativos.

Como se observa en la figura 31A, la actividad Topo I se incrementa claramente en la línea celular AA8 tras la irradiación en la fase G1, como se demuestra al aparecer mayor cantidad de ADN en estado relajado, siempre comparándolo con las mismas células y a los mismos tiempos pero sin ser irradiados (células controles). Este incremento en la capacidad de relajación de la Topo I existente en los extractos nucleares fue mayor a los 15 min que en el caso de analizarse una hora después de la irradiación. Una importante observación fue que a diferencia de la línea parental, la línea radiosensible EM9 no mostró incremento en la actividad Topo I después del tratamiento con 5Gy de rayos X. Con respecto a la actividad Topo II se observó igualmente un incremento tras la irradiación, en la línea AA8, aunque en este caso fue más evidente una hora después del tratamiento. En el caso de la línea EM9, aunque presentaba una mayor actividad Topo II basal que la línea parental (figura 31B), no mostraba ninguna modificación como consecuencia de recibir el tratamiento con rayos X, al igual que ocurría para la actividad Topo I.

El ensayo de actividad Topo I para las líneas celulares CHO K1/xrs-5, como podemos observar en la figura 32A, nos muestra que los extractos nucleares de las células de xrs-5 (mutante radiosensible) irradiadas presentan una menor actividad Topo I que los controles no irradiados y que la línea parental CHO K1, en la que dicha actividad Topo I no parece verse afectada como consecuencia de la irradiación. Con respecto a la Topo II (figura 32B), podemos observar como existe un incremento moderado de dicha actividad en los extractos nucleares procedentes de la línea parental CHO K1, 1h después de recibir 5Gy de rayos X. Contrastando con estas observaciones, el mutante xrs-5 mostraba una mayor actividad basal Topo II que la línea parental, aunque de forma señalada aparecía una fuerte inhibición enzimática 1h después de recibir el tratamiento.

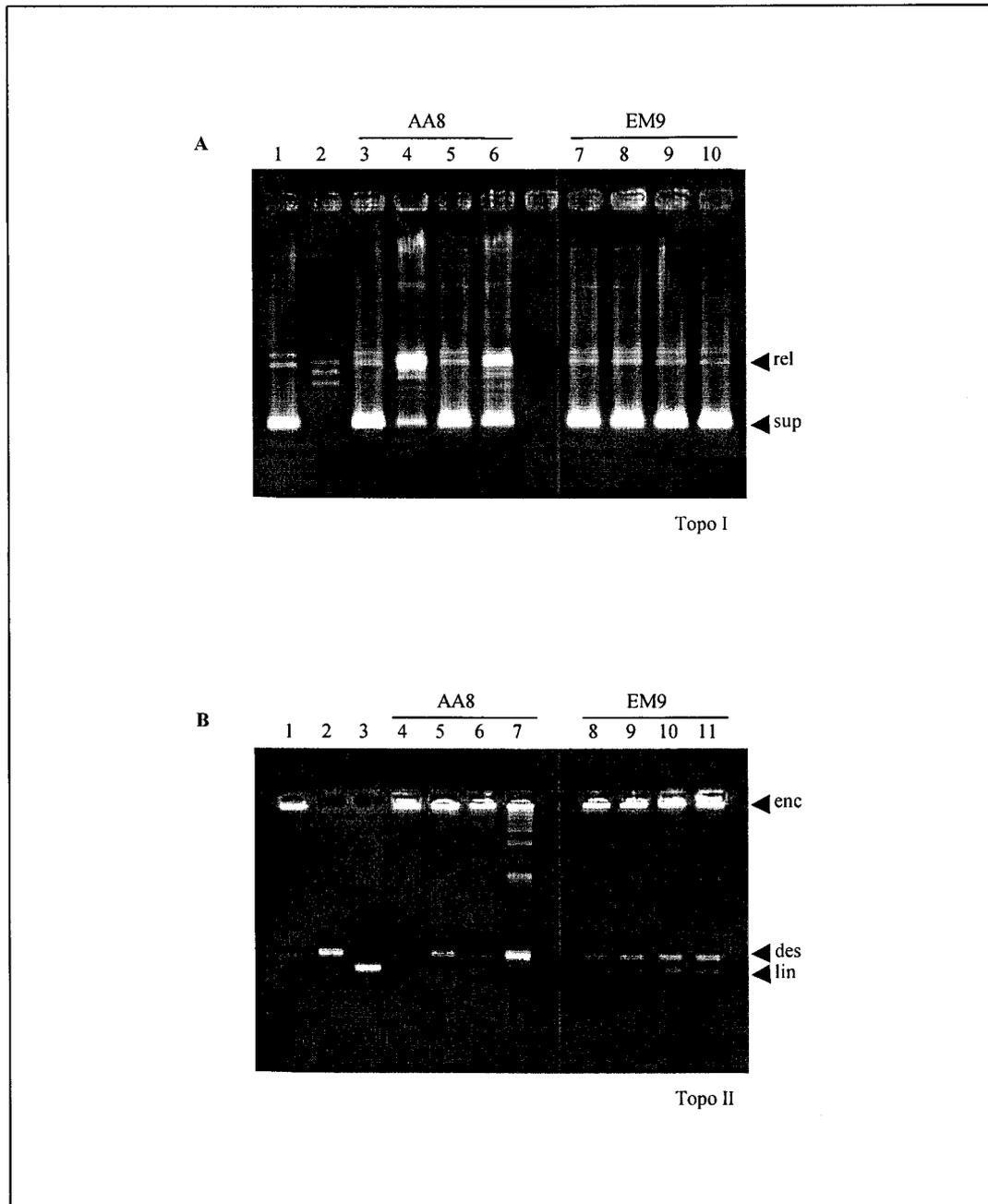


Figura 31. Estudio de la actividad relativa de la Topo I y Topo II en extractos nucleares de células AA8 y EM9 sincronizadas en G1, tratadas con 5Gy de rayos X y control. **(A)** Ensayo de actividad Topo I: calles 1 y 2, plásmido pRYG superenrollado (sup) y relajado (rel), respectivamente; calles 3, 5, 7 y 9, células no irradiadas; calles 4 y 8, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 6 y 10, muestras recogidas 1 h después de la irradiación. **(B)** Ensayo de actividad Topo II: calle 1, marcador de ADN encadenado (enc); calles 2 y 3, marcador de ADN desencadenado (des) y lineal (lin), respectivamente; calles 4, 6, 8 y 10, células no irradiadas; calles 5 y 9, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 7 y 11, muestras recogidas 1h después de la irradiación.

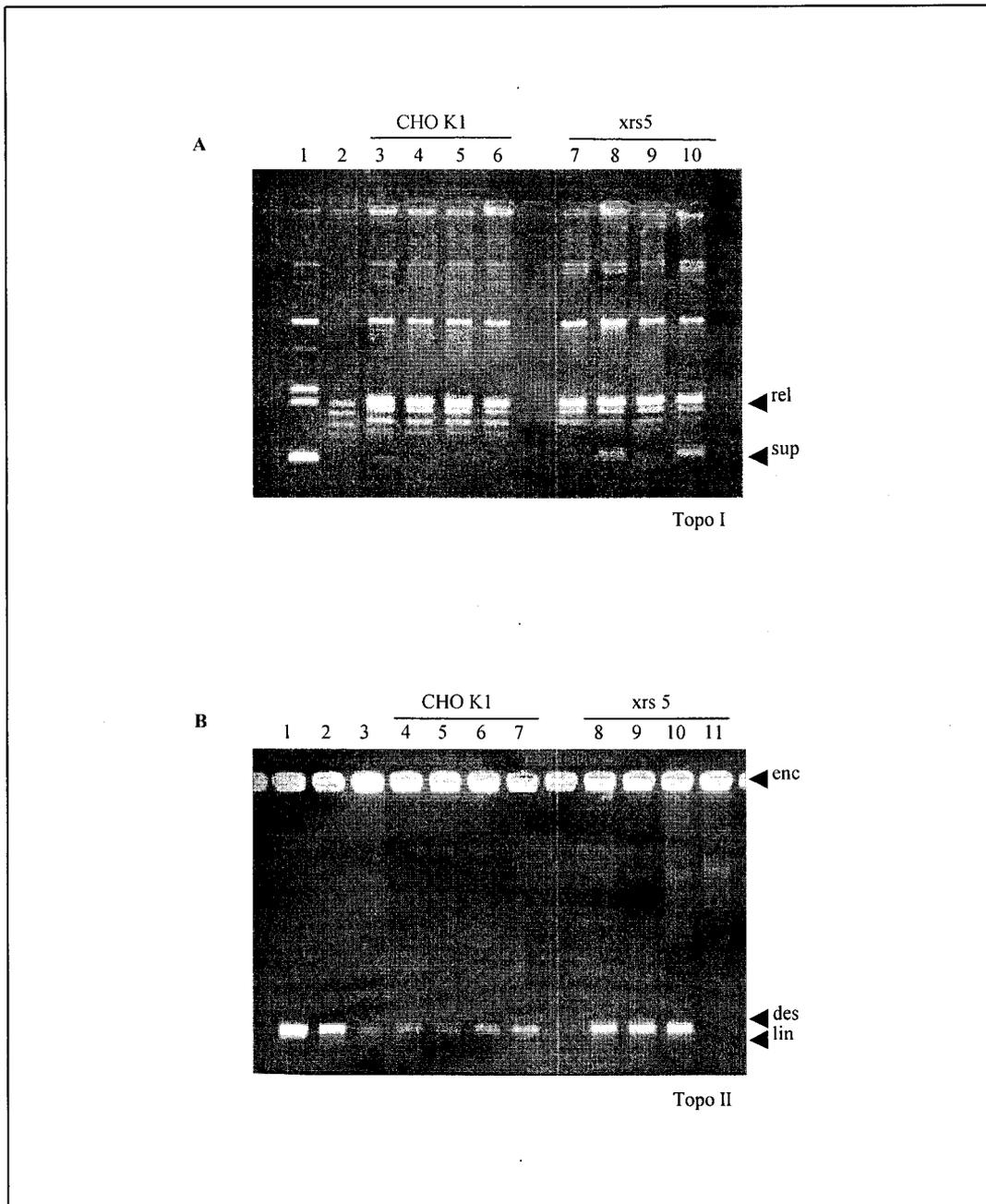


Figura 32. Estudio de la actividad relativa de la Topo I y Topo II en extractos nucleares de células CHO K1 y xrs 5 sincronizadas en G1, tratadas con 5Gy de rayos X y control. **(A)** Ensayo de actividad Topo I: calles 1 y 2, plásmido pRYG superenrollado (sup) y relajado (rel), respectivamente; calles 3, 5, 7 y 9, células no irradiadas; calles 4 y 8, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 6 y 10, muestras recogidas 1 h después de la irradiación. **(B)** Ensayo de actividad Topo II: calle 1, 2 y 3, marcador de ADN lineal (lin), desencadenado (des) y encadenado (enc), respectivamente; calles 4, 6, 8 y 10, células no irradiadas; calles 5 y 9, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 7 y 11, muestras recogidas 1 h después de la irradiación.

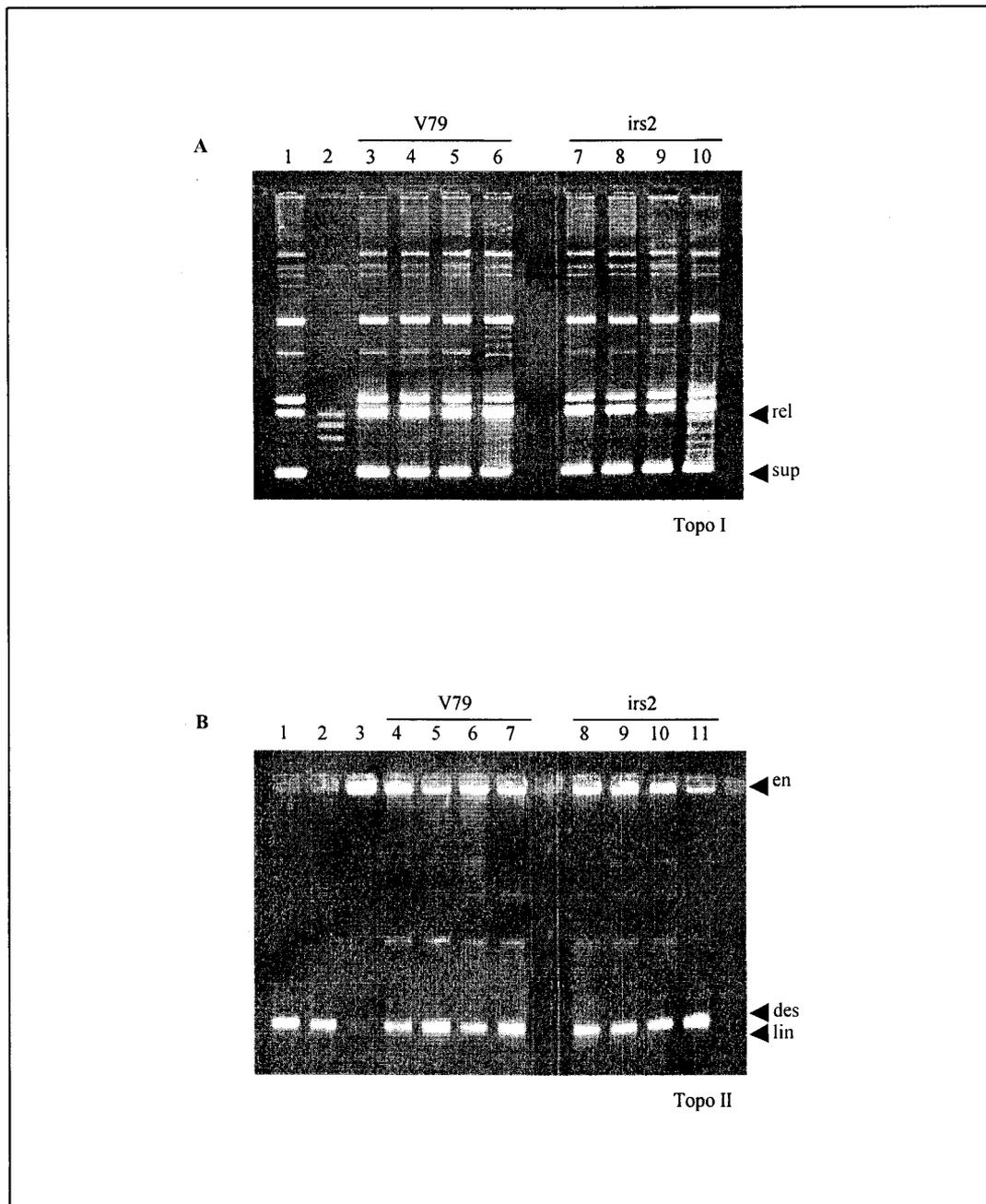


Figura 33. Estudio de la actividad relativa de la Topo I y Topo II en extractos nucleares de células V79 e *irs2* sincronizadas en G1, tratadas con 5Gy de rayos X y control. **(A)** Ensayo de actividad Topo I: calles 1 y 2, plásmido pRYG superenrollado (sup) y relajado (rel), respectivamente; calles 3, 5, 7 y 9, células no irradiadas; calles 4 y 8, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 6 y 10, muestras recogidas 1 h después de la irradiación. **(B)** Ensayo de actividad Topo II: calle 1, 2 y 3, marcador de ADN lineal (lin), desencadenado (des) y encadenado (enc), respectivamente; calles 4, 6, 8 y 10, células no irradiadas; calles 5 y 9, muestras recogidas 15 min después de la irradiación; calles 7 y 11, muestras recogidas 1h después de la irradiación.

Los resultados obtenidos para las líneas celulares V79/irs2 (figura 33) nos mostraban la existencia de un claro aumento de la actividad Topo I (figura 33A), 1h después de la irradiación con 5Gy de rayos X, en los extractos nucleares procedente tanto de la línea parental (V79) como de la línea mutante (irs2). Por otra parte, la actividad Topo II (figura 33B) mostraba igualmente un incremento moderado después de la irradiación tanto a los 15 min como 1 h después de recibir el tratamiento en el caso de la línea parental, mientras que en la línea irs2 solo observábamos este aumento 1h después del tratamiento.

En resumen, nuestros resultados muestran, en general, una clara modulación en la actividad Topoisomerasa en las líneas parentales como consecuencia de la irradiación, si bien las líneas radiosensibles han mostrado un comportamiento diferente. Esto se hizo especialmente evidente para el caso de las líneas AA8 y EM9.

3.2.2 Análisis inmunocitoquímico para la determinación de la expresión de las Topoisomerasas

Realizamos la determinación inmunocitoquímica de la Topo I y II, con la finalidad de averiguar si el incremento en la actividad catalítica observado en la línea parental AA8 después de la irradiación se debía a un incremento en la cantidad de enzima o más bien era consecuencia de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación (como vimos en la introducción). Para ello, células en cultivo asincrónicas se irradiaron con 5Gy de rayos X, y tanto 15 min como 1h después se procedió a la inmunotinción usando anticuerpos anti-Topo I o anti-Topo II de forma alternativa. Como se muestra en la Figura 34, los núcleos de la línea AA8 presentaban un claro incremento en la expresión de la enzima Topo I 1h después de la irradiación (figura 34B), en comparación con los controles no irradiados (figura 34A). Sin embargo, y a pesar del incremento que habíamos observado en la actividad Topo I 15 min después del tratamiento, a este tiempo no se observó tal incremento en cuanto a la expresión de la enzima. Por otra parte, en la línea celular EM9, en concordancia con lo observado en los ensayos de actividad, los niveles de Topo I aparecían inalterados después de la irradiación, sin mostrar diferencia aparente con las células controles tanto a los 15 min, como una hora después de recibir los 5Gy de rayos X (figura 34C y 34D). Con respecto a la Topo II no se observó ningún incremento de la cantidad relativa de la enzima en el núcleo tanto en la línea parental como en la línea mutante radiosensible.

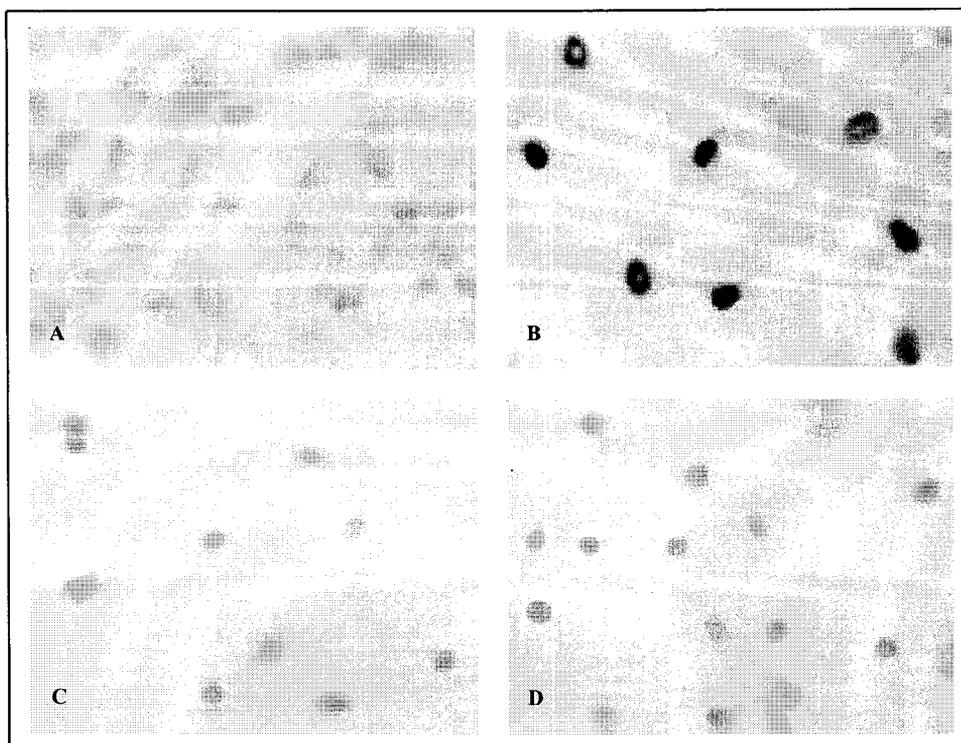


Figura 34. Topoisomerasa I en células controles e irradiadas, visualizadas por tinción inmunocitoquímica. (A) y (C) corresponden a células no irradiadas de AA8 y EM9, respectivamente. (B) y (D), células de AA8 y EM9, respectivamente, 1 h después de la irradiación con 5 Gy de rayos X. En la fotografía se observa un incremento significativo de la tinción con el anticuerpo anti-Topo I sólo en los núcleos de la línea parental 1 h después de la irradiación.

Estos mismos experimentos se realizaron en las líneas celulares (CHO K1/xrs-5 y V79/irs2) sin obtener diferencia alguna entre los núcleos de las células irradiadas y los de células controles.

3.2.3 Análisis de la cantidad celular total de Topoisomerasas

Para la determinación de posibles cambios de expresión de las Topoisomerasas, extractos proteicos nucleares procedentes de cultivos celulares control y de cultivos celulares irradiados, 15 min y 1h después de irradiar con una dosis de 5 Gy, se sometieron a electroforesis y a una posterior detección utilizando anticuerpos policlonales que reconocen a la Topo I o a la Topo II (Western blotting). Esto se realizó para cada una de las líneas utilizadas en los experimentos anteriores.

A diferencia de los cambios observados en las actividades Topoisomerasas, la cantidad total de enzima no parece cambiar de manera significativa en los tiempos muestreados después de la irradiación, cuando comparamos con células no irradiadas, para cada una de las líneas celulares utilizadas. En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos para la línea AA8.

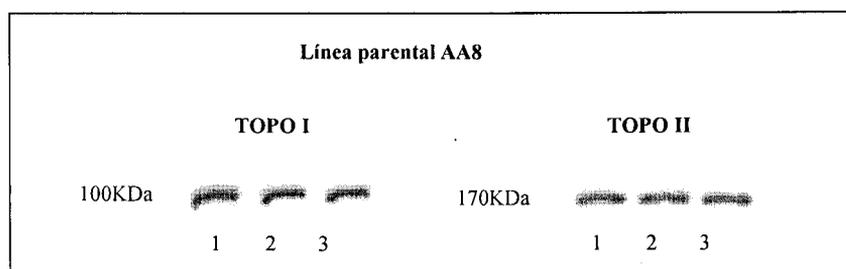


Figura 35. Análisis de la cantidad relativa de Topo I y II para la línea parental AA8 mediante electroforesis en geles de acrilamida y posterior transferencia a membranas de PVDF. La visualización de las bandas se llevó a cabo incubando con el anticuerpo anti-Topo I o anti-Topo II. En ningún caso se observa incremento en la cantidad de proteína 15 min (calle 2) o 1 h (calle 3) después de la irradiación, en comparación con células controles no irradiadas (calle 1).

3.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA II, BUFALIN E ICRF-193

En este apartado se pretendía conseguir la identificación de, al menos, un inhibidor de Topo II que, por una parte, provocase la inhibición de la enzima pero no mediante la estabilización del complejo de rotura, como es el caso de los venenos de Topoisomerasas, y que además fuese un inhibidor limpio, es decir, que no provocase daño en el ADN. Estos eran los requisitos que en nuestra opinión deberían cumplir alguno de estos compuestos para ser elegido y, posteriormente poder continuar con nuestras investigaciones iniciales acerca de si la inhibición de la Topo II podría modificar la tasa de reparación en células que, en presencia de dicho inhibidor recibieran la dosis elegida de rayos X. Las líneas celulares seleccionadas para llevar a cabo estos experimentos fueron la AA8 (parental) y EM9 (mutante deficiente en reparación) procedentes de ovario de hámster Chino, debido a que fueron las que mostraron, de forma más clara y contundente, una modulación de la actividad Topoisomerasa tras el tratamiento con rayos X (figura 31A y 31B). Así que desde este momento nos referiremos exclusivamente a ellas como objeto de los siguientes ensayos llevados a cabo.

3.3.1 Ensayos de citotoxicidad mediante la técnica de la tinción con sulforrodamina B (SRB)

El tratamiento de la línea parental AA8 así como la radiosensible EM9 con la bis-dioxopiperazina ICRF-193, considerada por muchos autores como un verdadero inhibidor catalítico de Topo II, provocó una disminución significativa de la viabilidad celular a partir de una concentración de $0.05\mu\text{M}$, como observamos en los datos obtenidos mediante el test de SRB y que se representan en la figura 36A. Por otra parte, también podemos observar

una aparente menor sensibilidad de la línea mutante EM9 a este compuesto con respecto a la línea parental AA8. Esta diferencia de sensibilidad al compuesto entre la línea parental y la radiosensible resultó ser estadísticamente significativa tras aplicar el test *t*-Student, para una $p < 0.05$.

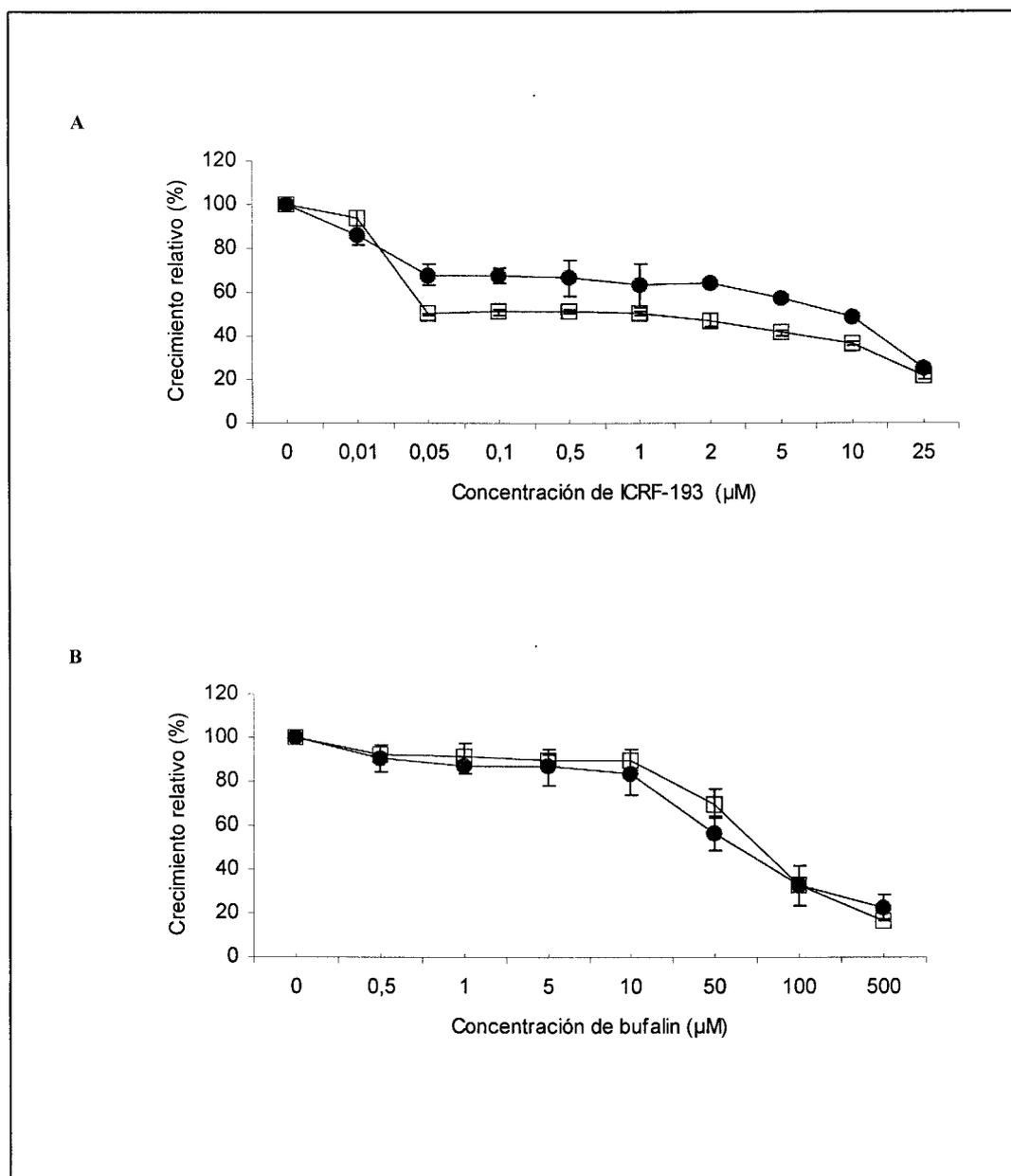


Figura 36. Efectividad de diferentes concentraciones de los inhibidores de Topo II ICRF-193 (A) y bufalin (B) para inhibir el crecimiento celular en las líneas mutante de CHO EM9 (●) y su correspondiente línea parental AA8 (□), mediante el ensayo de la SRB. Las barras indican la desviación estándar a partir de tres experimentos independientes. Análisis estadísticos (*t*-test Student's) muestran la existencia de diferencias significativas ($p=0.02$) entre ambas líneas celulares sólo en el caso del ICRF-193.

Estos mismos protocolos experimentales se llevaron a cabo con el compuesto bufalin, que igualmente provocó una dramática disminución de la supervivencia celular, más evidente a dosis mayores de 10 μM (figura 36B). A diferencia de los resultados

obtenidos para el compuesto ICRF-193, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la línea parental y la radiosensible.

3.3.2 Efecto del ICRF-193 y del bufalin sobre la actividad catalítica Topo II

En concordancia con el efecto negativo de estos dos compuestos en la supervivencia celular (figura 36), se demostró que tanto el ICRF-193 como el bufalin fueron capaces de inhibir de manera eficiente la actividad catalítica Topo II *in vivo*, y analizada en los respectivos extractos nucleares de las líneas AA8 y EM9.

La figura 37 muestra la pérdida de capacidad para desencadenar ADN encadenado de doble cadena de cinetoplasto (kADN) tras el tratamiento con el inhibidor catalítico de Topo II ICRF-193 en las líneas AA8 (figura 37A) y EM9 (figura 37B). Como podemos concluir de la comparación de estos resultados, existe una buena correlación entre la capacidad del ICRF-193 para inhibir la actividad Topo II y el efecto negativo que provocó este compuesto en la supervivencia celular, como se mostraba mediante el ensayo de SRB (figura 36).

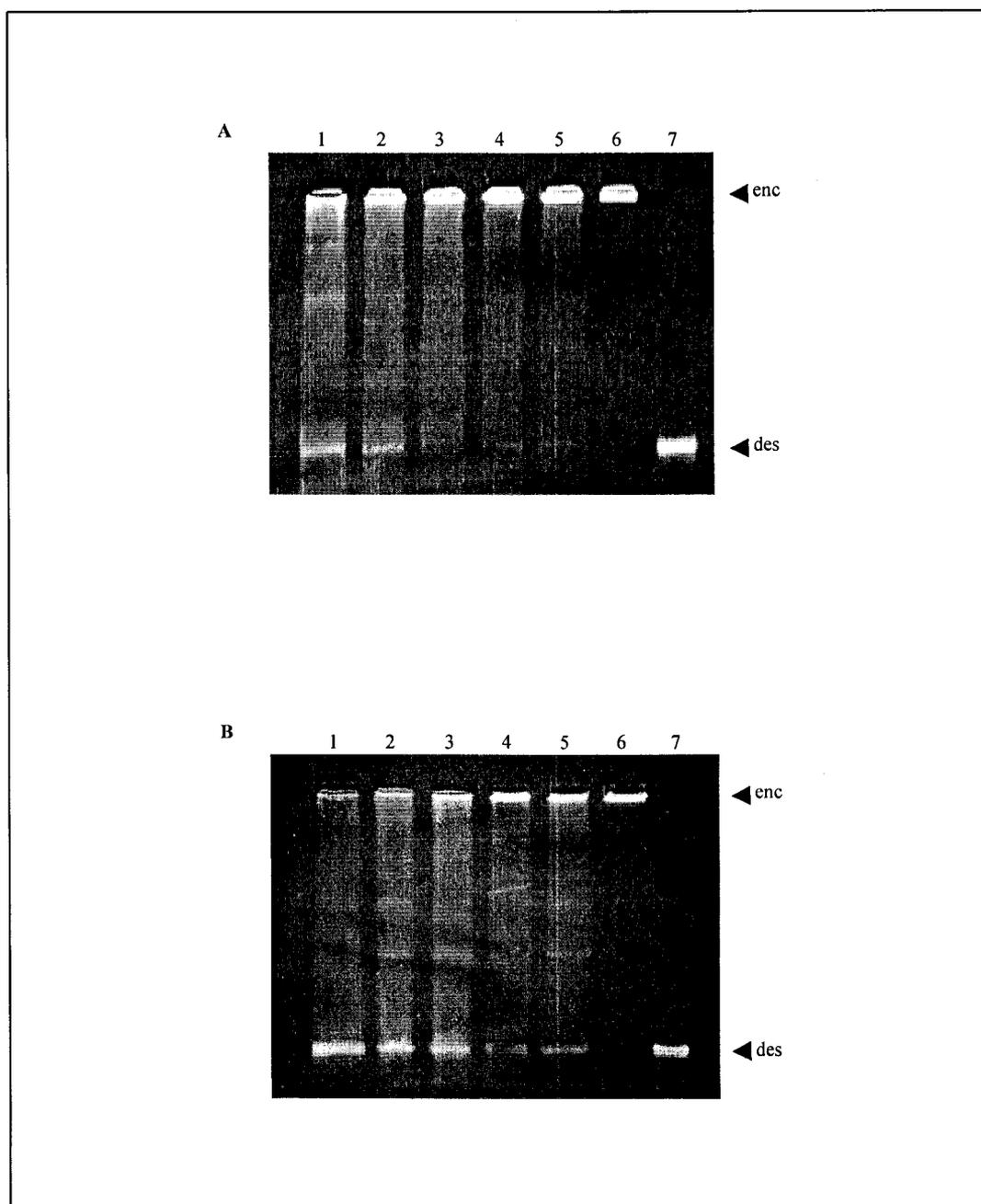


Figura 37. Inhibición de la actividad catalítica Topo II tras el tratamiento de 22 h con el compuesto ICRF-193. (A) Capacidad para desencadenar ADN de cinetoplasto encadenado (kADN) en AA8 y (B) igual para la línea EM9. Para ambas líneas celulares, calle 1, control; calle 2, 2 μM de ICRF-193; calle 3, 5 μM ; calle 4, 10 μM ; calle 5, 25 μM ; calles 6 y 7, marcador de ADN encadenado de cinetoplasto (enc) y desencadenado (des), respectivamente.

Con respecto al bufalin (figura 38), se observaron resultados similares en cuanto a la eficiencia para inhibir la actividad catalítica Topo II en ensayos *in vivo*, tanto en la línea AA8 (figura 38A) como en EM9 (figura 38B). En este caso, observamos igualmente una buena correlación entre las dosis de bufalin que provocaban una disminución de la supervivencia celular (figura 36) y aquellas dosis capaces de provocar una inhibición clara de la actividad catalítica Topo II.

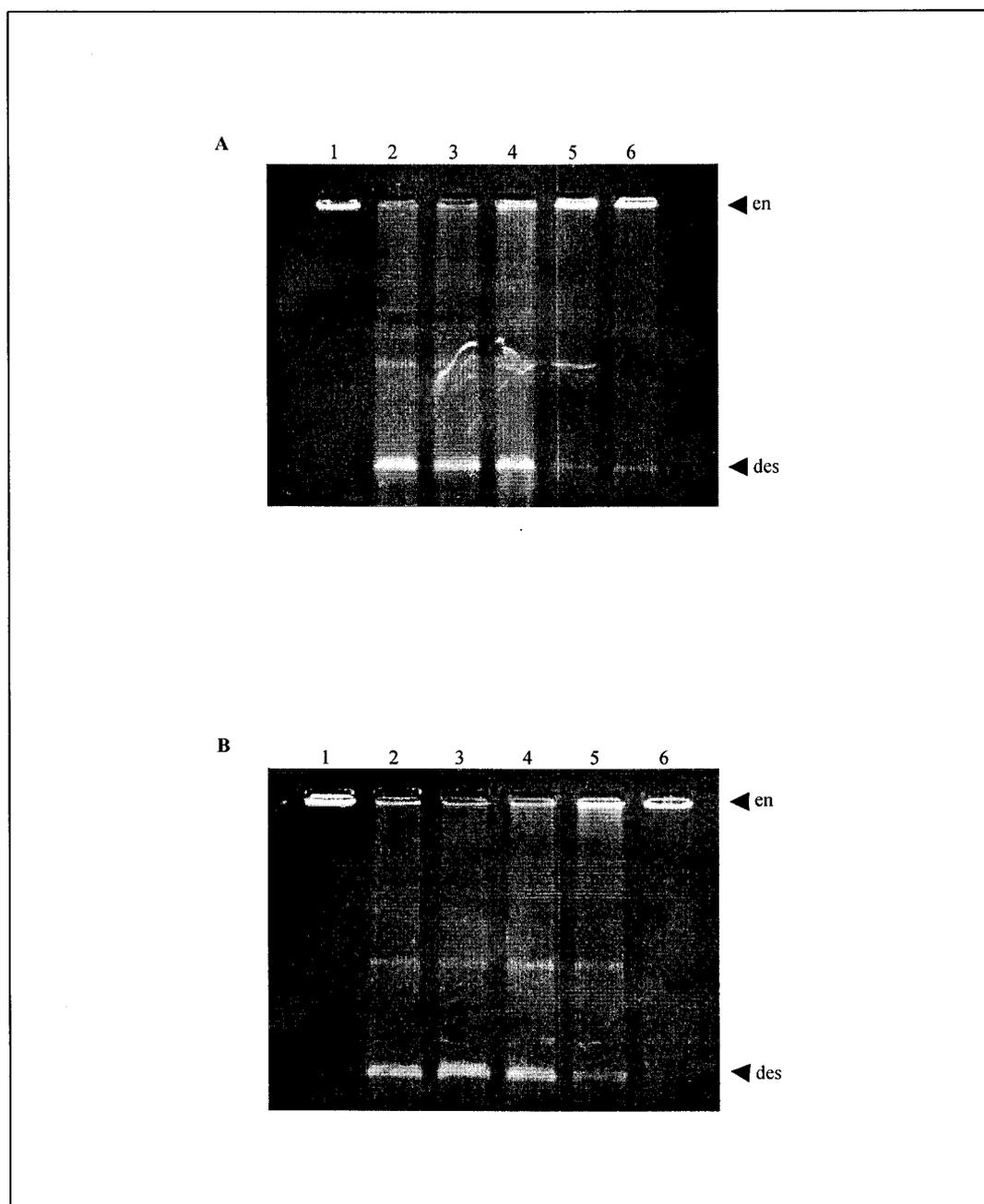


Figura 38. Inhibición de la actividad catalítica Topo II tras el tratamiento de 22 h con el compuesto bufalin. (A) Capacidad para desencadenar ADN de cinetoplasto encadenado (kADN) en AA8 y (B) igual para la línea EM9. Para ambas líneas celulares, calle 1, marcador de ADN encadenado de cinetoplasto (enc); calle 2, control; calle 3, 1 μM de bufalin; calle 4, 10 μM ; calle 5, 100 μM y calle 6, 500 μM .

Es importante destacar, por otra parte, los resultados que obtuvimos cuando analizamos la actividad Topo II *in vitro* con el compuesto bufalin, es decir, cuando extractos nucleares de células que habían crecido sin recibir tratamiento alguno, se incubaron con distintas concentraciones del inhibidor, a diferencia del ensayo *in vivo*, en el que como hemos visto antes el inhibidor se adicionaba al cultivo celular y posteriormente se extraían las proteínas nucleares. A diferencia de la inhibición de la actividad Topo II observada en la figura 38 (análisis *in vivo*), el análisis obtenido mediante los experimentos

llevados a cabo *in vitro* no mostraba ninguna modificación de la actividad enzimática Topo II en los extractos incubados con las distintas concentraciones de bufalin, tanto en AA8 como en EM9, presentando así la misma actividad que en células controles (incubadas en ausencia del compuesto) (figura 39B).

A diferencia del bufalin, los análisis *in vitro* llevados a cabo en presencia de ICRF-193 (figura 39A), sí mostraban inhibición de la actividad catalítica Topo II de manera dosis dependiente, de forma semejante a los resultados obtenidos mediante los análisis *in vivo*.

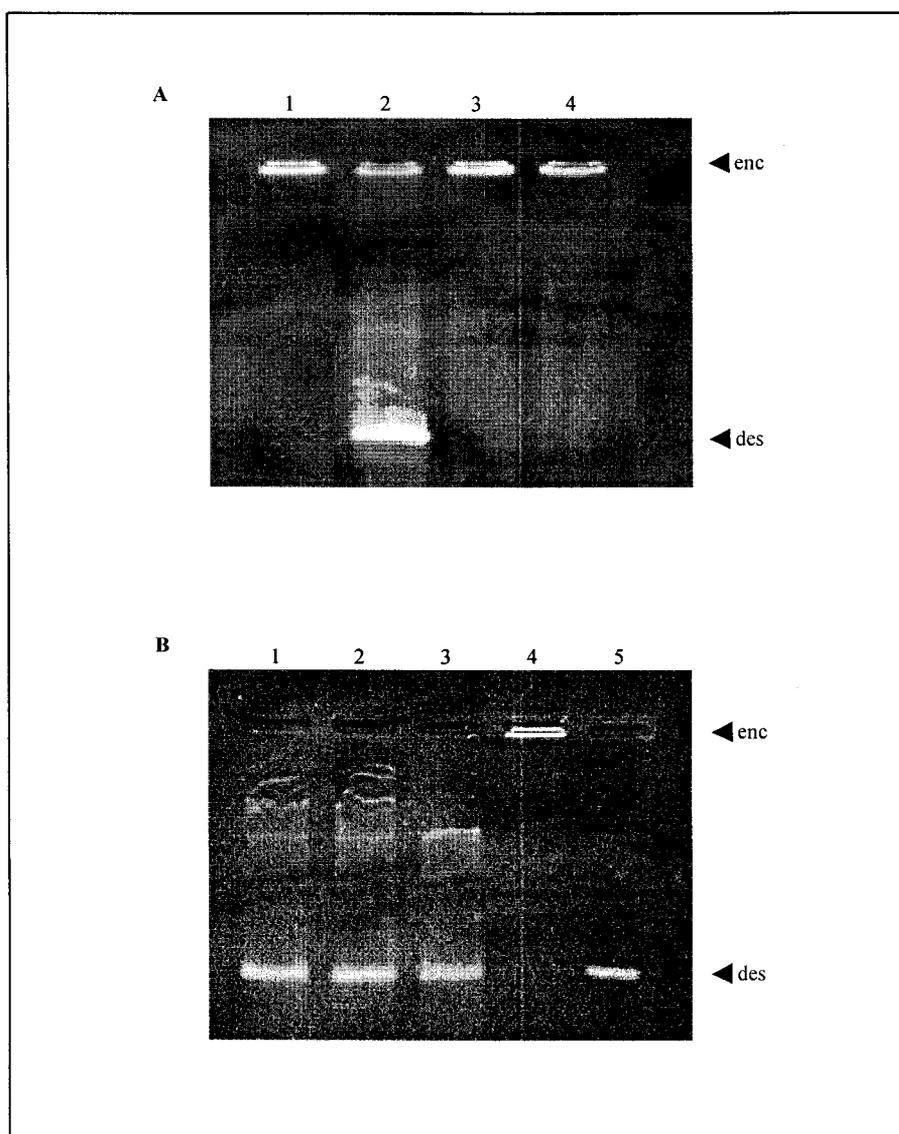


Figura 39. Ensayo *in vitro* de la actividad catalítica Topo II después de la incubación del extracto de proteína nuclear de células AA8 controles con el compuesto ICRF-193 (A) o bufalin (B). (A) calle 1, marcador encadenado (enc); calle 2, control; calles 3 y 4, 10 μ M y 25 μ M de ICRF-193, respectivamente. (B) calle 1, control; calles 2 y 3, 100 μ M y 500 μ M de bufalin, respectivamente; calle 4, marcador encadenado de cinetoplasto (enc) y calle 5, marcador desencadenado (des).

3.3.3 Análisis de la producción de aberraciones cromosómicas

Como se puede observar en la Tabla X, el compuesto ICRF-193 poseía un efecto clastogénico que se manifiesta de manera dosis-dependiente para dosis de 5×10^{-3} μM y superiores. En la mencionada tabla se puede observar que la línea mutante EM9 acumuló un mayor número de aberraciones, tras el tratamiento, que la línea parental AA8, como ocurre generalmente para cualquier agente clastogénico, dado el defecto de la línea mutante para reparar las roturas de cadena de ADN.

Por su parte, contrastando con el claro efecto clastogénico del ICRF-193, el bufalin no fue capaz de provocar daño cromosómico a ninguna de las concentraciones empleadas en estas dos líneas celulares y para ninguno de los protocolos seguidos (ya sea dejando 5 h de recuperación o sin recuperación en absoluto).

Dosis	Tipo de aberraciones cromosómicas						
	RC	RI	I	D	A	AM	% AC (\pm S.D)
AA8							
Control	3	3	0	2	0	0	$4.0 \pm 0,43$
10^{-3} μM	4	3	0	2	0	0	$4.5 \pm 0,41$
5×10^{-3} μM	3	7	3	1	1	0	$7.5 \pm 0,54$
10^{-2} μM	11	20	2	2	2	23	$18.5 \pm 1,03$
5×10^{-2} μM	22	88	73	15	9	111	$104.5 \pm 1,99$
0.1 μM	-	-	-	-	-	-	NC
EM9							
Control	5	10	3	2	0	0	$10 \pm 0,62$
10^{-3} μM	4	9	1	5	0	1	$10 \pm 0,62$
5×10^{-3} μM	10	20	3	1	1	1	$18 \pm 0,82$
10^{-2} μM	8	34	10	11	1	25	$32 \pm 1,10$
5×10^{-2} μM	32	185	101	32	8	73	$179 \pm 2,62$
0.1 μM	-	-	-	-	-	-	NC

Tabla 4. Frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en células de AA8 y EM9 tratadas con diferentes concentraciones de ICRF-193. RC, roturas cromatídicas; RI, roturas isocromatídicas; I, intercambios; D, dicéntricos; A, anillos; AM, aberraciones múltiples. Esta última no se incluyó en la estadística. Se contaron un total de 200 metafases para cada concentración. NS, no cuantificable.

3.3.4 Producción de células endorreduplicadas

Una interesante observación fue que tras el tratamiento de células AA8 y EM9 con el compuesto ICRF-193, utilizando dosis entre 0.025 y 1 μM se detectó la presencia de células mitóticas que mostraban diplocromosomas como resultado del fenómeno de endorreduplicación, como se observa en la figura. 40A.

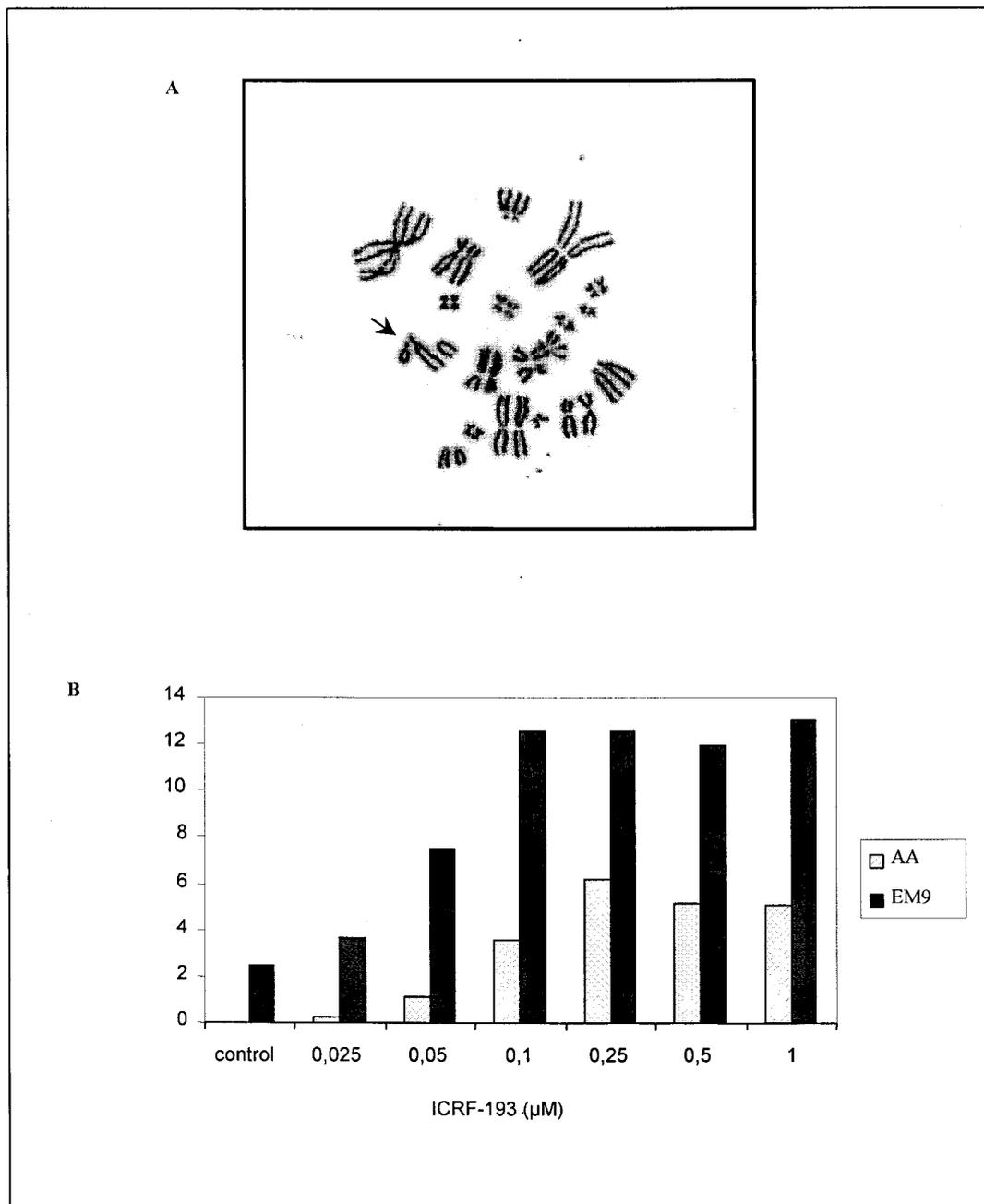


Fig.ura 40. (A) Célula endoreduplicada de EM9 mostrando diplocromosomas (formados por 4 cromátidas) en metafase después del tratamiento con 0.05 μM de ICRF-193. La flecha señala una aberración cromosómica inducida por este inhibidor catalítico de Topo II. (B) Producción de células endoreduplicadas en respuesta al tratamiento con el inhibidor de Topo II ICRF-193. Se puede observar que en ausencia de tratamiento con el inhibidor no se observaron células endoreduplicadas en las AA8, a diferencia de la línea EM9 en la que se encontraron aproximadamente un 2 %. Incluso teniendo en cuenta este nivel basal de endoreduplicadas en la línea mutante, existe una frecuencia de endoreduplicadas en EM9 extremadamente alta (*t*-Student's, $p < 0.001$), en comparación con la línea parental y para cada una de las concentraciones utilizadas. Concentraciones de 2 μM y mayores afectaban de forma muy negativa a la división celular.

Esta observación está de acuerdo con resultados similares previamente publicados para el tratamiento con los venenos de Topo II etoposido (VP-16) y mitoxantrona (Sumner, 1998). En la figura 40B se muestran los porcentajes de metafases que presentaron diplocromosomas en las líneas AA8 y EM9 tratadas con ICRF-193. Dicha figura representa la media obtenida de tres experimentos independientes, en los que se analizaron un total de 2000 metafases, para cada una de las concentraciones empleadas, al igual que para el control, en cada una de los experimentos realizados. Habría que destacar que, como resulta evidente de la observación de la figura, para cualquiera de las dosis elegidas de este compuesto, el número de células endorreduplicadas obtenido fue siempre considerablemente mayor en la línea mutante EM9 que en la línea parental, además de que las células controles de la línea mutante EM9 presentaban, aún en ausencia del tratamiento, un cierto nivel basal de células endorreduplicadas, a diferencia de lo que se observó para la línea parental AA8, en la cual la observación de endorreduplicación espontánea era extremadamente infrecuente (Cortés y col., 1993).

De igual forma, se analizó la posibilidad de que el bufalin provocase endorreduplicación cromosómica y, en claro contraste con el ICRF-193, en ningún caso se observaron células mitóticas con diplocromosomas, ni en la línea parental AA8 ni en la mutante en reparación EM9.

Los experimentos realizados en este apartado con el ICRF-193 se llevaron a cabo con un tiempo de tratamiento de 3h, tiempo que es inferior a los empleados en los apartados anteriores en los que se analizó la actividad enzimática Topo II y la producción de aberraciones cromosómicas, entre otros; por lo que fue necesario comprobar que efectivamente 3h de tratamiento eran suficientes para provocar la inhibición de la actividad Topo II, como se muestra en la figura 41. Estos experimentos se llevaron a cabo con el compuesto ICRF-193 y en las líneas AA8 y EM9. Por otra parte, con 3h de tratamiento igualmente se observaron células con aberraciones cromosómicas, como la que se observa en la figura X, de tal forma que pudimos constatar que dosis superiores a 1 μ M provocaban una cantidad de aberraciones que impedía que las células alcanzasen la fase de mitosis, siendo pues imposible llevar a cabo un análisis de la producción de células endorreduplicadas.

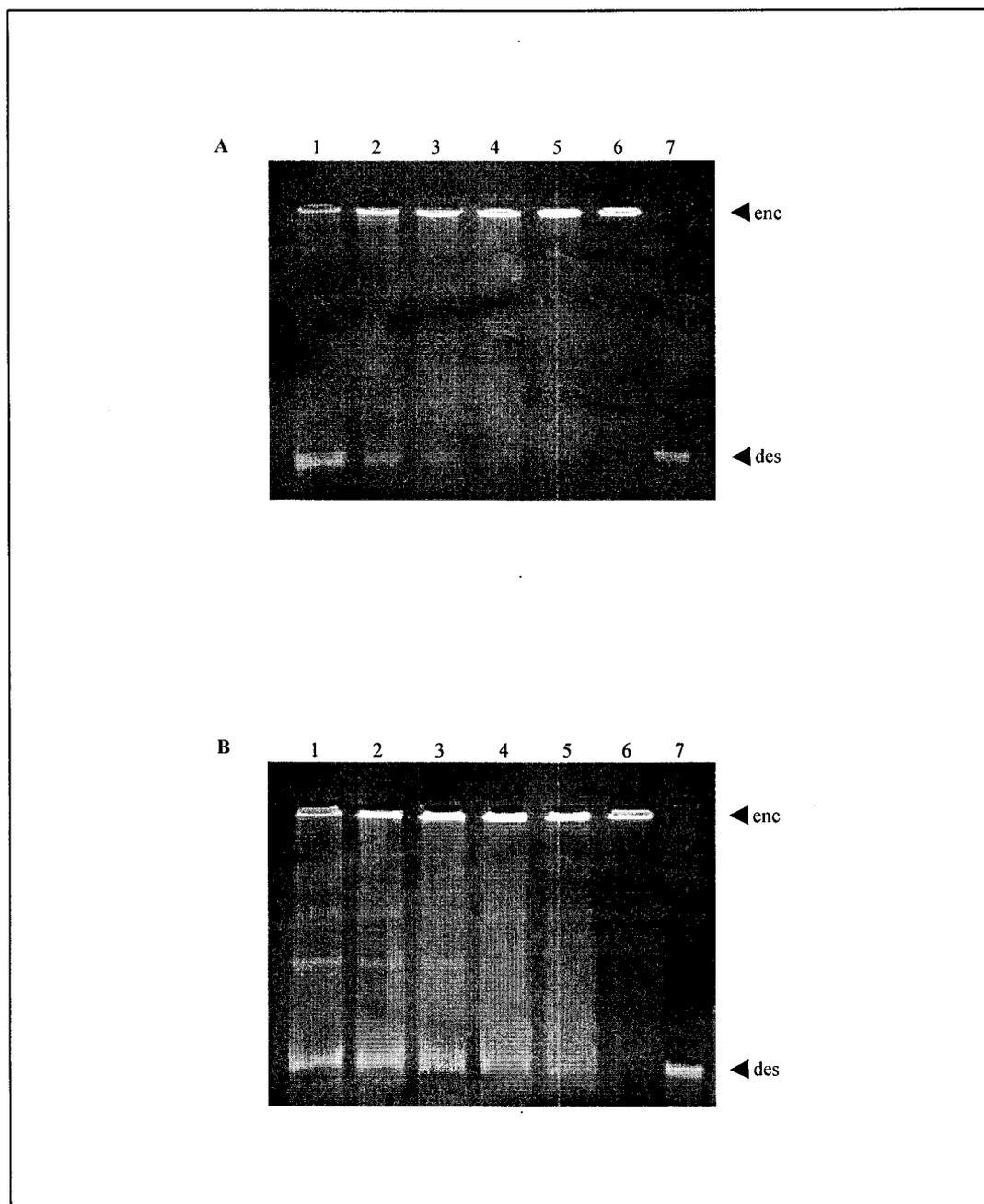


Figura 41. Inhibición de la actividad catalítica Topo II tras el tratamiento de 3 h con el compuesto ICRF-193. (A) Capacidad para desencadenar ADN de cinetoplasto encadenado (kADN) en AA8 y (B) igual para la línea EM9. Para ambas líneas celulares, calle 1, control no tratado con ICRF-193; calles 2-5, tratadas con concentraciones crecientes del inhibidor (1, 2, 5 y 10 μ M, respectivamente); calle 6, marcador de ADN encadenado de cinetoplasto (enc) y calle 7, marcador desencadenado (des).

3.3.5 Ensayo del cometa para la cuantificación de daño en el ADN producido por estos compuestos

La figura. 42 muestra los resultados obtenidos (se representa la media de tres experimentos independientes) tras realizar el ensayo del cometa en células AA8 y EM9, tratadas durante 3h con el compuesto ICRF-193 y procesadas inmediatamente después, para el análisis del daño cromosómico, en condiciones de ausencia de reparación. En estas gráficas se puede observar un claro incremento de los momentos de las colas de los cometas (parámetro que proporciona una medida de la fragmentación del ADN) tanto en células AA8 como en EM9. Una interesante observación fue que el mutante EM9 (figura 42B) presentó una mayor sensibilidad al ICRF-193 que la línea parental AA8 (figura. 42A), para cualquiera de las dosis empleadas de este compuesto, lo cual se puso de manifiesto mediante la detección de valores más altos de los momentos de las colas de los cometas. En la figura 43 se puede visualizar una imagen obtenida del ensayo del cometa.

Del mismo modo, y con objeto de establecer una comparación se analizó la capacidad del bufalin para producir daño en el ADN y, de forma contraria a lo observado con el ICRF-193, no se observó ningún incremento de los momentos de las colas de los cometas a ninguno de los tiempos de tratamientos empleados y a ninguna de las dosis elegidas, tanto para la línea AA8 como para la EM9, en la que todos los núcleos (controles y tratados) presentaban forma redondeada (ausencia de fragmentación del ADN).

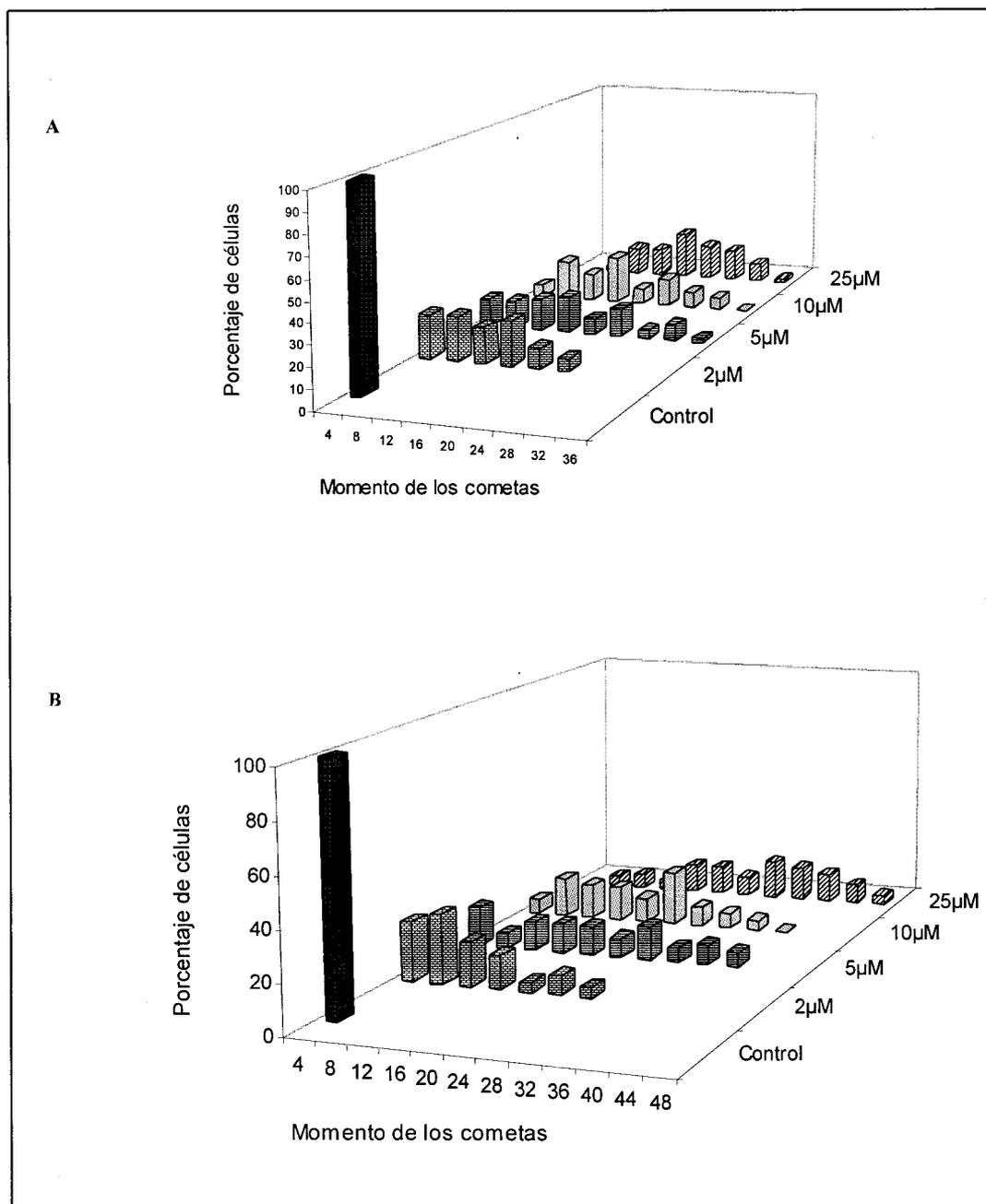


Figura 42. Efectividad de diferentes dosis del inhibidor catalítico de Topo II ICRF-193 para inducir daño en el ADN en AA8 (A) y EM9 (B), mediante el ensayo del cometa. Se puede observar un incremento dosis-dependiente de los momentos de los cometas para las dos líneas, en comparación con los controles no tratados (*t*-test de Student's, $p < 0.0001$).



Figura 43. Imagen obtenida del ensayo del cometa. Tras la lisis y electroforesis celular, las células se tiñeron con bromuro de etidio. Aquí se muestran varios cometas con distinto nivel de daño en el ADN, que se refleja en la distinta longitud e intensidad de las colas.

3.4 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y REPARACIÓN DEL MISMO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL INHIBIDOR DE TOPO II BUFALIN

Una vez elegido el bufalin como inhibidor de la Topo II por no inducir daño en el ADN ni en los cromosomas *per se*, en primer lugar llevamos a cabo un estudio dosimétrico utilizando diferentes dosis de rayos X mediante el ensayo cometa, en ausencia de reparación (tiempo 0h), tanto en la línea parental AA8 como en la mutante EM9. Los resultados obtenidos (figura 44) muestran que la línea mutante presenta mayor sensibilidad a los rayos X que la línea parental, ya que para cualquiera de las dosis de rayos X utilizadas se observan momentos de las colas de los cometas mayores en las células EM9 que en las AA8. Por este motivo, las dosis elegidas para la línea parental fueron algo mayores que las utilizadas para la línea mutante radiosensible. Tras obtener estos resultados y con la finalidad de llevar a cabo estudios comparativos de la eficiencia de la reparación del daño en el ADN en presencia y ausencia del inhibidor de Topo II bufalin, se eligieron las dosis de 4 Gy de rayos X para la línea AA8 y de 3 Gy para la línea EM9. Con esta finalidad, células irradiadas con las dosis escogidas se incubaron a 37°C inmediatamente después de irradiar y se mantuvieron en recuperación durante periodos que iban desde 15 min hasta un máximo de 3 h (figura 45).

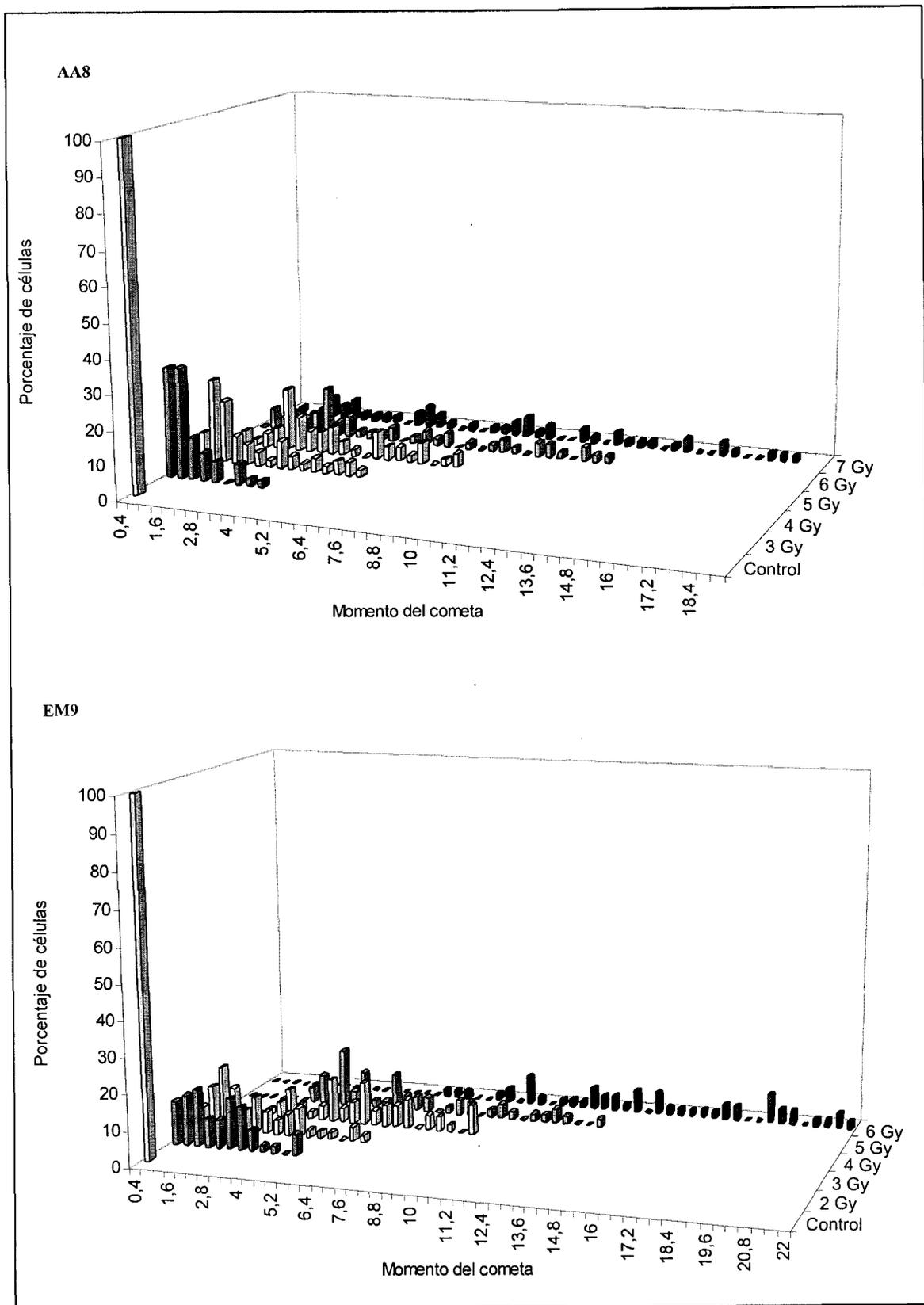


Figura 44. Dosimetría de rayos X, mediante el ensayo del cometa en células AA8 y EM9. En ambas líneas se observa un incremento del daño en el ADN dosis-dependiente, siendo más sensible la línea mutante que la parental.

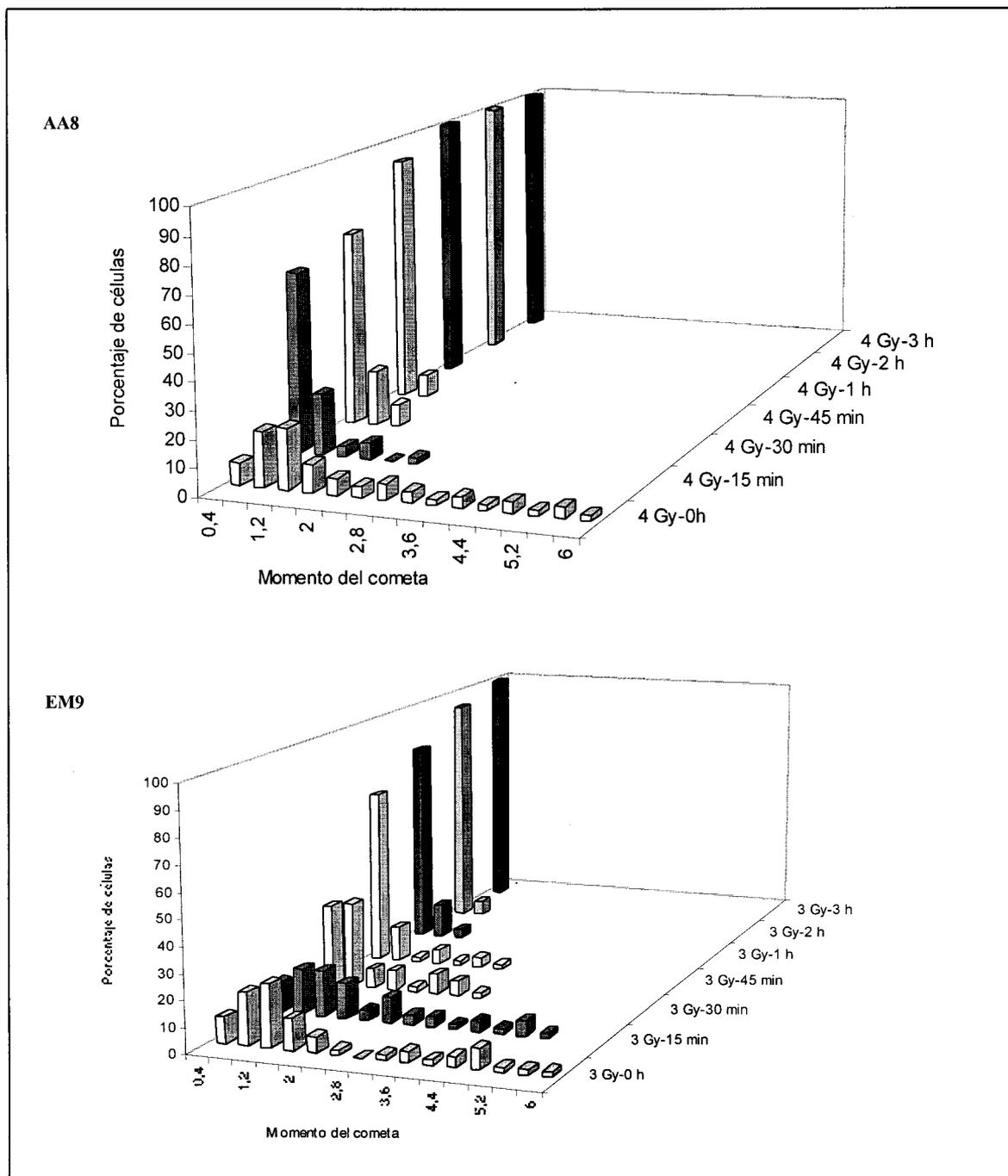


Figura 45. Cuantificación de la reparación del daño en el ADN a distintos tiempos después de la irradiación con 4 Gy para la línea parental y con 3 Gy para la mutante. En ambas líneas se eligió la dosis de rayos X que provocase un daño inicial equiparable. Se puede observar como la línea parental completa la reparación en 1h, a diferencia de la línea mutante defectuosa en reparación, la cual necesita 3h.

Estos mismos experimentos se llevaron a cabo igualmente en presencia de bufalin, como puede observarse en la figura 46, el daño inicial resultó ser diferente, a las dosis de rayos X elegidas, en ausencia (daño inicial mayor) y en presencia de bufalin (daño inicial menor). Está descrito que el DMSO es un agente radioprotector, y para comprobar que el efecto observado se debía a este disolvente (ya que el bufalin solo se disuelve en DMSO, no existiendo alternativa), se llevaron a cabo experimentos para cuantificar el daño inicial mediante la utilización de electroforesis de ADN en campo pulsante. En la figura 47 podemos observar que efectivamente, cuando se irradian células en presencia de DMSO el daño inicial observado era menor que el que se apreciaba en ausencia del mismo, lo cual nos planteaba un serio inconveniente para poder alcanzar nuestros objetivos experimentales.

Para poder continuar con nuestro planteamiento inicial, la alternativa consistió en que el estudio comparativo se llevó a cabo utilizando las dosis de 4 Gy de rayos X para la línea parental AA8 y de 3 Gy para la línea EM9, en ausencia de bufalin; y de 5 Gy para AA8 y 4Gy para EM9 en presencia de bufalin. Así, en un experimento y en otro, el daño inicial es, de acuerdo con nuestros resultados, muy similar, lo cual es necesario para poder llevar a cabo el estudio comparado de la cinética de reparación de estas células con y sin inhibición de Topo II a lo largo del tiempo.

La figura 45 muestra los resultados en cuanto a daño en el ADN obtenidos a tiempo 0 horas (en ausencia de reparación) y tras incubar a 37 °C durante diferentes intervalos de tiempo, en ausencia de bufalin. Como se mencionó anteriormente con respecto al estudio de la dosimetría, el daño inicial obtenido irradiando con 4 Gy la línea parental, era parecido al obtenido irradiando con 3 Gy la línea mutante. Igualmente se observa una deficiencia en la reparación en la línea mutante con respecto a la línea parental y esto es consecuencia del defecto que esta línea presenta en la reparación de las roturas de cadena en el ADN como las inducidas por radiación ionizante (Thompson y col., 1982), de forma que en EM9 es necesario un tiempo de incubación de 3h para que las células reparen el daño inicial que observamos con el ensayo cometa, mientras que la línea parental AA8 es capaz de reparar este daño en tan sólo 1 h.

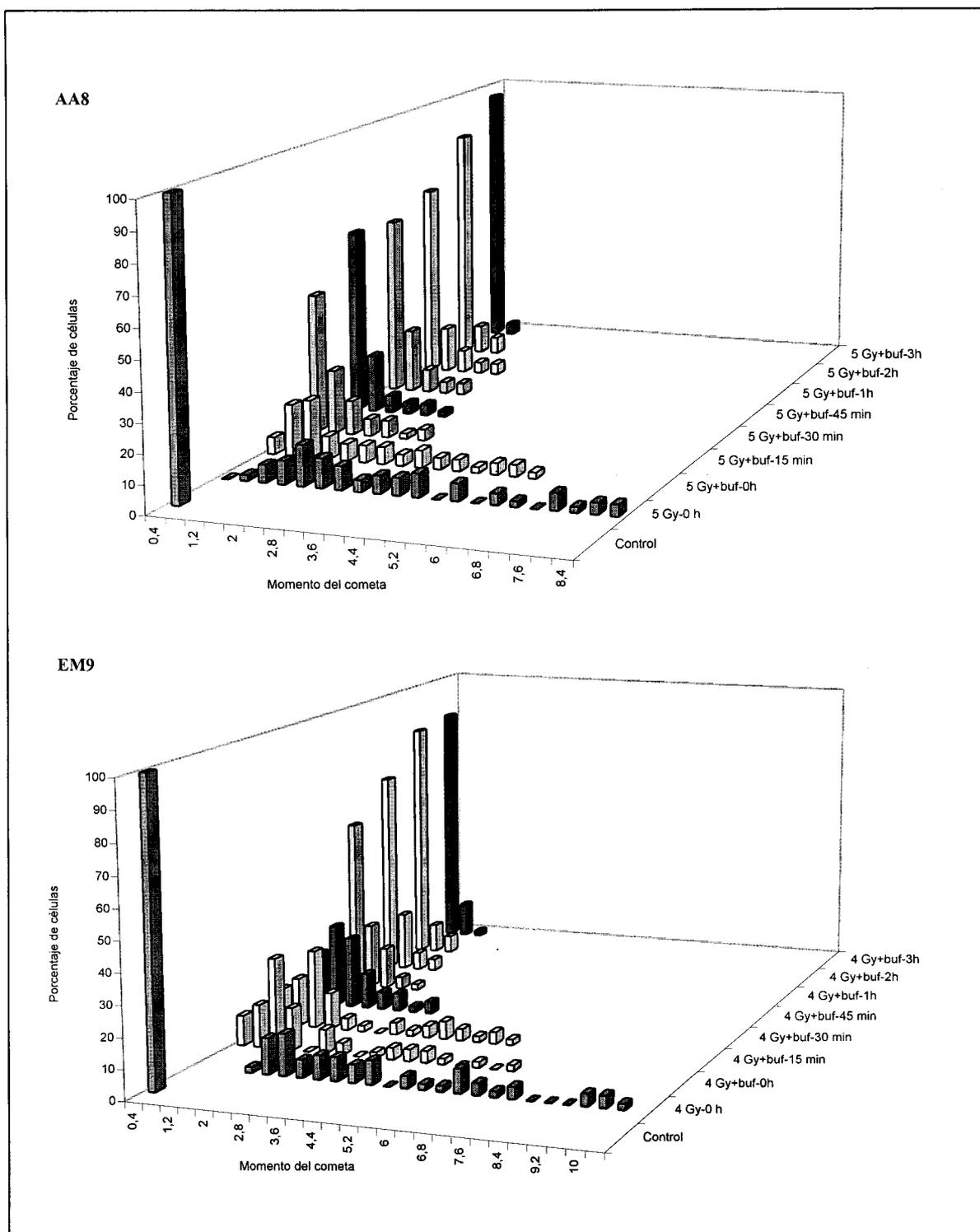


Figura 46. Cuantificación de la reparación del daño en el ADN, a distintos tiempos después de la irradiación con 5 Gy de rayos X para la línea parental y de 4 Gy para la mutante, en presencia del inhibidor de Topo II bufalin. A diferencia de la figura anterior, y para las dos líneas celulares, el tratamiento con bufalin presumiblemente a través de la inhibición de la Topo II, desencadena una cinética de reparación más lenta que la observada en ausencia del inhibidor de Topo II, no completándose totalmente la reparación del daño inicial en 3 h.

Los resultados obtenidos en presencia de bufalin, y por lo tanto cuando las células tienen menor actividad Topo II (figura 38), se muestran en la figura 46. Al igual que en la figura anterior la reparación del daño inicial observado en la línea parental es más rápida que la observada para la línea mutante. Pero lo más significativo es que la reparación, en general para las dos líneas celulares, es más lenta cuando se encuentra presente el bufalin, es decir, cuando la Topo II está inhibida, de tal forma que 3 h de incubación no fueron suficientes para completar la reparación del daño inicial en ningún caso, a diferencia de lo observado en ausencia de inhibición de la enzima nuclear. A nuestro juicio este resultado es de máxima importancia, en el sentido de que parece apoyar la hipótesis de la necesidad de una Topo II plenamente operativa para una eficaz reparación del daño infligido al ADN por la radiación ionizante.

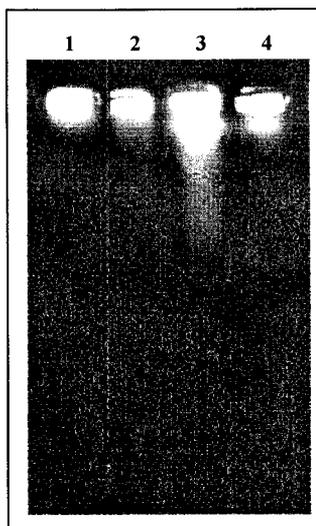


Figura 47. Electroforesis de campo pulsante de células AA8. Calle 1, control; calle 2, tratamiento con 10% DMSO durante 22 h; calle 3, 50 Gy de rayos X; calle 4, irradiación con 50 Gy en presencia del tratamiento con 10% DMSO durante 22h. El daño se midió inmediatamente después de los tratamientos (tiempo 0h). Se observa claramente como el daño producido por los rayos X es menor en presencia del agente radioprotector DMSO (calle 4), que en ausencia de éste (calle 3).

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Las Topoisomerasas de ADN son enzimas que se encargan de llevar a cabo los cambios topológicos que sufre el ADN en procesos celulares tan importantes como la replicación, la transcripción, la segregación, etc. Dichos cambios topológicos los efectúan las Topoisomerasas a través de roturas y reuniones del ADN que han de tener lugar de forma concertada para que el funcionamiento sea correcto.

Debido al mecanismo de acción que estas enzimas poseen, se ha propuesto un posible papel de las Topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN. En los últimos 20 años se han publicado una gran cantidad de resultados, en muchos casos contradictorios, con respecto a esta cuestión, y aunque en la mayoría de los trabajos publicados hasta ahora se observa un incremento en la actividad Topoisomerasa después de inducir daño en el ADN, no se ha podido concluir más allá de cualquier duda razonable que las Topoisomerasas desempeñen algún papel clave, ya sea de forma directa ó indirecta en la reparación.

Los primeros trabajos de investigación sobre la posible implicación de la Topo II en la reparación del ADN fueron llevados a cabo por Collins y Johnson (1979). Estos investigadores estaban interesados, en general, en los efectos de inhibidores de la síntesis de ADN sobre la frecuencia de las roturas de cadena producidas como consecuencia de los procesos que tienen lugar en la reparación por escisión. Se sabe que durante este proceso en primer lugar se rompe la cadena de ADN por una endonucleasa de reparación muy cerca de la lesión. Dado que la posterior escisión llevada a cabo por una exonucleasa, la resíntesis de la región escindida por una polimerasa, y el posterior sellado de la rotura por una ligasa es un proceso muy rápido, normalmente las roturas de cadenas transitorias creadas durante la reparación por escisión son difíciles de detectar bioquímicamente (Friedberg y col., 1995). Sin embargo, esta dificultad puede ser salvada utilizando inhibidores de la reparación del ADN, como la citosina arabinosido (araC), la cual retrasa el proceso de escisión y provoca la acumulación de las roturas de cadena.

Los experimentos de Collins y Johnson (1979) en células HeLa revelaban que el tratamiento con novobiocina, un inhibidor potente de la Topo II, no resultaba en la acumulación de las roturas de cadena después de la irradiación con UV. Además impedía el incremento en la cantidad de roturas, que por otra parte se detectarían utilizando los inhibidores de síntesis de ADN como la araC. Así se concluyó que la novobiocina inhibía algún paso de preincisión, y se estableció una relación entre el papel de la novobiocina

como inhibidor de la Topo II y una posible actividad Topo responsable de este paso de preincisión necesario para que la reparación por escisión se lleve a cabo.

Resultados similares a los publicados para la novobiocina fueron pronto obtenidos usando ácido nalidíxico, otro inhibidor de Topo II conocido, en células de mamíferos tratadas con UV o con otros agentes que provocasen daño en el ADN (Collins y col., 1980; Mattern y Scudiero, 1981; Cleaver, 1982; Mattern y col., 1982). Sin embargo, aunque esta hipótesis era muy atractiva, la idea de que la Topo II pudiera desempeñar un papel directo en un paso preparativo en la reparación por escisión, basándose en los resultados anteriormente mencionados sobre el efecto provocado con la novobiocina y el ácido nalidíxico, fue pronto puesta en duda debido a que la especificidad de estos antibióticos como inhibidores de Topoisomerasas era algo más que cuestionable.

Desafortunadamente, se ha puesto de manifiesto no obstante que la novobiocina es un inhibidor no específico que tiene otros blancos aparte de la Topo II, como la ATPasa mitocondrial, causando una seria interrupción del metabolismo energético, que podría inhibir entre otras muchas cosas el paso de incisión en la reparación por escisión, ya que dicho proceso es dependiente de ATP (Dresler y Lieberman, 1983; Downes y col., 1985). Otro blanco de la novobiocina relevante en la reparación por escisión es la ADN polimerasa α . Igualmente, se ha propuesto una falta de especificidad para el ácido nalidíxico, ya que también interfiere con las funciones de la mitocondria (Gallagher y col., 1986) e inhibe la polimerasa α *in vitro* (Poulson y col., 1974).

4.1 TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO POR RADIACIÓN

En lo que se refiere a la posible participación de las Topoisomerasas de ADN en la reparación del daño producido en la célula por la radiación ionizante en particular, Johnstone y Mc Nerney (1985) encontraron que la actividad de la Topo I en extractos nucleares, obtenidos en linfocitos humanos de sangre periférica y en cultivos de células linfoblastoides, aumentaba unas tres veces en un período corto después de la irradiación con rayos γ . Los autores afirmaron, en base a sus observaciones, que cualquiera que fuera la base del cambio en la actividad Topo inducida por la radiación, era lo opuesto a lo esperado por una predicción sencilla a partir de estudios de enzimas aisladas, en los cuales se demostraba (Ferro y Olivera, 1984) que la poli-ADP-ribosilación (normalmente activada por roturas en el ADN como las producidas por radiación ionizante) de las Topoisomerasas resulta en la inactivación de dichas enzimas nucleares (Johnstone y Mc Nerney, 1985). Una conclusión de estos experimentos fué que el corto período de tiempo transcurrido después

de la irradiación (5 min) para que se observara un incremento de la Topo I, por otra parte, apuntaría más bien a modificaciones post-traducionales, ya que dicho tiempo sería claramente insuficiente para que se hubiese producido un aumento en la expresión de la proteína.

Otros autores observaron también una correlación positiva entre el grado de activación de la Topo II y radioresistencia en fibroblastos humanos (Cunningham y col., 1991), lo cual parecía estar en sintonía con los resultados antes descritos (Johnstone y McNerney, 1985). Además, se encontró que líneas celulares radiosensibles de linfoma de ratón presentaban una alteración de la Topo I (Kowalska-Loth y col., 1993), mientras que bajos niveles de Topo II hacían a las células más sensibles a agentes que provocaban daño en el ADN (Froelich-Ammon y Osheroff, 1995).

Thielmann y Popanda (1998a), utilizando líneas celulares de fibroblastos normales y de XP, demostraban la existencia de un incremento de la Topo II α , dependiente del tiempo y de la dosis, después de la irradiación. Estos autores apoyan la idea de que la Topo II α podría estar implicada en pasos preparatorios de la reparación por escisión y que precedería al paso de incisión específica de la reparación. En el caso de XP, este paso de incisión es defectuoso, pero los pasos preparatorios anteriores son similares a los de células normales (Hoeijmakers y Bootsma, 1990). Por lo tanto, los fibroblastos de XP irradiados, al igual que los normales, sobreexpresarían la Topo II α (o movilizarían la enzima preexistente) y relajarían los dominios superenrollados del ADN dañado, pero a diferencia de las células normales, las XP serían incapaces de llevar a cabo la reparación por escisión. A la vista de esta interpretación, Thielmann y Popanda (1998a) no esperaban que las células de XP expresaran menos Topo II α que las células normales, y, de acuerdo con sus expectativas, en efecto no vieron ninguna diferencia en sus experimentos. De acuerdo con dichos autores, este incremento podría reflejar una mayor accesibilidad de la enzima, un incremento en la expresión del gen, o un aumento en la estabilización del ARNm o de la proteína. El efecto se detectó 1h después de la irradiación utilizando dosis de ≥ 3 J/m² de luz UV o ≥ 3 Gy de rayos γ , lo cual resulta de interés desde el punto de vista de la discusión de nuestros propios resultados, como veremos más adelante.

Con respecto a la Topo I, que en condiciones normales se encuentra concentrada en el nucleolo, después de la irradiación con rayos γ observaron un cambio en el patrón de distribución, apareciendo multitud de centros enriquecidos en Topoisomerasa I que reflejaban sitios de transcripción de genes inducidos por la irradiación.

Una de las primeras investigaciones llevadas a cabo acerca del posible papel de la Topo I en la reparación del daño por luz UV concluyó con la demostración de que dicho daño en el ADN estimulaba la interacción de la Topo I con el ADN, y se propuso que las alteraciones estructurales en el ADN inducidas por las lesiones, provocadas por UV podría ser el estímulo suficiente para inducir incisión y unión covalente de la Topo I al ADN (Lanza y col., 1996).

Subramanian y colaboradores (1998), por su parte, observaron que la exposición de las células a la irradiación UVB resultaba en una rápida movilización de la Topo I hacia el genoma y una estimulación de la formación de complejos covalentes Topo I-ADN, con un incremento del orden de unas 8 veces más. Sin embargo, dado que los niveles de proteína Topo I no se incrementaban, se concluyó que era la enzima pre-existente en la célula la que estaba siendo reclutada hacia los sitios de daño en el ADN, con una mayor producción de complejos covalentes ADN-Topo I en o cerca de los dímeros de ciclopirimidina. Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que la Topo I sería una enzima eficaz en la reparación *in vivo* (Subramanian y col., 1998).

Con un enfoque totalmente distinto a los anteriores, Gaffney y col. (2000) llevaron a cabo experimentos en *S. cerevisiae* usando mutantes Topo II termosensibles, de forma que la inactivación de la enzima Topo II incrementaba la radiosensibilidad celular, ya que se impedía la reunión de las roturas en el ADN como se observó por electroforesis de campo pulsado. Sin embargo la sobreexpresión del gen Topo II no alteraba la radiosensibilidad, lo cual indicaría que el pool de la enzima en condiciones normales sería suficiente para hacer frente al daño por radiación. Estos resultados apoyan también en buena medida un papel para la Topo II en la reparación de las roturas de cadena.

Contrastando claramente con lo observado en células humanas por Johnstone y McNerney (1985), se ha publicado más recientemente la existencia de una regulación a la baja de la Topo I en células de hámster en un cultivo parado en confluencia siguiendo el tratamiento con radiación ionizante (Boothman y col., 1994) y esta disminución en la actividad Topo I se propuso como una posible ADP-ribosilación de la enzima como consecuencia de las roturas de cadena de ADN creadas por los rayos X.

También en células de hámster Chino, se vio una disminución dosis-dependiente de la actividad Topo I, como consecuencia del tratamiento con rayos X (Zanier y col., 1996). Una explicación de estos resultados conflictivos en roedores (Boothman y col., 1994; Zanier y col., 1996) comparados con los publicados en células humanas (Johnstone y McNerney, 1985) no es posible por el momento, más allá de la mera especulación.

En general, es importante señalar no obstante que los resultados contradictorios en cuanto a la posible implicación de las Topoisomerasas en la reparación han sido fruto de estudios llevados a cabo usando cultivos asincrónicos, sin tener en cuenta las dramáticas fluctuaciones de los niveles y actividades de las Topoisomerasas dependiendo de la fase del ciclo celular y de la tasa de proliferación, principalmente para la Topo II (Duguet y col., 1983).

En la presente tesis doctoral hemos estudiado las posibles fluctuaciones de las actividades Topo I y II, así como de los niveles de estas enzimas después del tratamiento con rayos-X. Los experimentos se llevaron a cabo tanto en líneas celulares parentales, las cuales presentan una cinética de reparación normal (AA8, CHO K1, y V79) como en líneas celulares mutantes radiosensibles, portadoras de diferentes mutaciones (EM9, xrs-5 e irs-2).

En cuanto a los resultados que hemos obtenido se observó un claro incremento de las actividades Topo I y II después de tratar a las células con 5 Gy de rayos X en el caso de la línea parental AA8, además de observarse un incremento en la tinción inmunocitoquímica que se realizó en esta línea parental, 1h después de la irradiación, para la Topo I. Estos resultados fueron, por otra parte, claramente diferentes a los obtenidos en la línea radiosensible EM9, en la que no se observó incremento alguno en respuesta al tratamiento con radiación en lo que se refiere a actividad y cantidad de Topo I y II (Pastor y col., 1999). De manera similar también hemos observado una modulación de la actividad Topoisomerasa, como consecuencia del tratamiento con rayos X, en extractos nucleares de células sincronizadas en G1 de las líneas CHO K1/xrs-5 y V79/irs-2 (Pastor y Cortés, 2002), si bien es cierto que no de forma tan clara como en las líneas AA8/EM9. Esta modulación de la actividad Topoisomerasas pudimos observar que no se correspondía con un incremento de la cantidad de las enzimas cuando se analizó mediante western blotting. Teniendo en cuenta este último resultado, la explicación más probable en nuestra opinión para el claro y casi inmediato incremento de las actividades Topoisomerasas en la línea AA8, así como de las modulaciones de las actividades Topoisomerasas observadas en el resto de las líneas analizadas después de la irradiación, puede encontrarse en cambios o modificaciones pos-traduccionales, como fosforilación, más que como consecuencia de nueva síntesis de proteína. Por lo tanto, el incremento de tinción para la Topo I observado con inmunocitoquímica 1h después de la irradiación sería probablemente consecuencia del reclutamiento de dicha proteína en centros localizados, y posiblemente esta focalización se corresponda con zonas en las que exista una intensa actividad de transcripción,

supuestamente de genes de respuesta al daño. Estos resultados están en concordancia con otros anteriormente publicados y a los que hemos hecho referencia (Lanza y col., 1996; Thielmann y Popanda, 1998a; Subramanian y col., 1998).

En cualquier caso, respecto a la cuestión que nos ocupa de la posible implicación de las Topoisomerasas en los mecanismos de reparación del daño en el ADN, podemos considerar sin duda de gran interés el hecho de que existan diferencias en la respuesta a los rayos X, en lo que se refiere a las actividades Topoisomerasas, entre las líneas mutantes defectuosas en la reparación del daño por radiación (EM9 y xrs-5) y sus correspondientes líneas parentales (AA8 y CHO K1, respectivamente) (Pastor y col., 1999; Pastor y Cortés, 2002).

Por otra parte, los resultados obtenidos en la línea parental V79 y su mutante radiosensible *irs-2* merecen especial consideración, ya que ésta última no es defectuosa en reparación sino que presentan una síntesis de ADN radioresistente que las asemeja a las células del síndrome humano AT (Zdzienicka y col., 1989). Por lo tanto, la replicación tiene lugar de forma continuada de manera que se van acumulando lesiones en el ADN, siendo éste el origen de la radiosensibilidad que esta línea presenta. Los análisis de las actividades Topoisomerasas en estas líneas celulares nos muestra un incremento de la actividad Topo I 1 h después del tratamiento con 5 Gy de rayos X, sin observarse diferencia alguna entre la línea parental y la mutante. Para la Topo II, la irradiación incrementa débilmente la actividad de esta enzima tanto en la línea parental como en la mutante, aunque en esta última se observa mayor diferencia 1h después de la irradiación. Estos resultados parecen estar en concordancia con la característica que presenta esta línea radiosensible (síntesis de ADN radioresistente) a diferencia de las otras líneas radiosensibles que comentamos anteriormente (defectuosas en reparación) (Pastor y Cortés, 2002).

4.2 TOPOISOMERASAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO QUÍMICO; PAPEL EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

El resultado del ataque químico al ADN es principalmente el daño de las bases, el cual puede resultar en la distorsión de la molécula de una forma similar a la inducida por la luz UV. Considerando que la reparación del daño químico tiene lugar fundamentalmente mediante la reparación por escisión, con la generación de roturas transitorias en el ADN, la posible implicación de las Topoisomerasas ha suscitado también un gran interés en este campo.

En apoyo de un posible papel de las Topoisomerasas de ADN en la reparación del daño químico, se ha observado que la expresión de la Topo II α está asociada con la resistencia a agentes alquilantes antitumorales (Eder y col., 1995). La sobreexpresión de la Topo II se llevó a cabo concretamente transfectando la Topo II α en la línea EMT6 (línea de carcinoma de mama de ratón). Esta línea celular transfectada expresaba de forma continua el ARNm y la proteína Topo II α , y se vio que estos transfectantes eran aproximadamente entre 5 y 10 veces más resistentes a la muerte celular provocada por los agentes alquilantes antineoplásicos como cisplatino y mecloretamina. En base a estas observaciones se propuso que el mecanismo de esta resistencia podría implicar un incremento en la unión de la Topo II α al ADN dañado por los agentes alquilantes, siendo así más eficiente la reparación (Eder y col., 1995). En concordancia con estos resultados, se publicó asimismo que un incremento en la actividad Topo II parecía contribuir a la resistencia que presentan las células de fibrosarcoma de hámster Chino al cisplatino y a la mostaza nitrogenada. De forma similar, se demostró que células con niveles comparativamente bajos de Topo II eran más sensibles a cisplatino, carmustina, mitomicina C y a mostaza nitrogenada (Larsen y col., 1998). Para apoyar el papel de las Topoisomerasas de forma directa o indirecta en la respuesta al daño químico, se ha demostrado recientemente que después del tratamiento de fibroblastos humanos normales y de XP con la droga antitumoral doxorubicina, se detectó un incremento en la cantidad de la Topo II α nuclear dependiente del tiempo y de la dosis (Thielmann y Popanda, 1998b).

Por otra parte, en la línea celular MCF7 de cáncer de mama se ha demostrado que los niveles de la Topoisomerasa I se incrementan después del tratamiento con el agente alquilante bifuncional y antitumoral mitomicina C (Gobert y col., 1996). Sin embargo, Webster y Bhattacharya (1995) publicaron resultados contradictorios después de suministrar a ratas los hepatocarcinógenos aflatoxina B1 y N-nitrosodimetilamina, que causan roturas de cadena simple en el ADN nuclear hepático. Concretamente, una disminución en la actividad Topoisomerasa se observó de forma paralela al incremento de la actividad de la poli (ADP-ribosa) polimerasa. Los autores concluyeron, en clara controversia con otros anteriormente mencionados, que la Topoisomerasa de ADN estaba sometida a una regulación negativa siguiendo al daño en el ADN. Hemos de decir, por otra parte, que desafortunadamente, en este último artículo no se hizo distinción alguna entre la Topo I y la Topo II. Aunque nuestras investigaciones se han centrado fundamentalmente en el papel de las Topoisomerasas en la reparación del daño producido en el ADN por la

radiación ionizante, nuestros resultados también entrarían en aparente contradicción con los de estos últimos autores.

4.3 REGULACIÓN DE LAS TOPOISOMERASAS POR EL GEN P53 DESPUÉS DEL DAÑO EN EL ADN

Normalmente, el daño en el ADN desencadena múltiples cascadas de reacciones, las cuales afectan a la reparación del ADN, a la progresión del ciclo celular y a la apoptosis. Uno de los componentes más importantes implicados en la regulación de estas rutas inducidas por estrés es la proteína supresora de tumores p53. En este tema que nos ocupa, resultados recientes sugieren que la p53 también es capaz de modular a la actividad Topo I directamente, por una asociación molecular, o mediante regulación transcripcional. Se ha visto que la expresión de p53 conduce a una regulación a la baja de la transcripción de la Topo II α (Sandri y col., 1996; Wang y col., 1997). Otros trabajos describen la formación de complejos moleculares entre Topo II β y p53 (Yuwen y col., 1997). Finalmente, p53 y Topo I forman complejos moleculares *in vitro* los cuales estimulan la actividad catalítica de la Topo I (Gobert y col., 1996). Estos últimos autores llevaron a cabo una serie de experimentos con los que se llegó a comprobar que p53 y Topo I también se asocian en células vivas. El tratamiento con mitomicina C de células de carcinoma de mama humano MCF-7 resultaba en una translocación de p53 del citoplasma hacia el núcleo dependiente del tiempo. Ésto se acompaña de un incremento en la actividad Topo I la cual, al menos en parte, se debe a la formación de complejos moleculares Topo I-p53 (Gobert y col., 1996). Estos resultados sugieren que dentro del mecanismo general de la respuesta mediada por la p53 ante el daño en el ADN podría estar implicada la regulación de la actividad Topoisomerasa. Esto llevaría a la conclusión de que la actividad Topoisomerasa se podría regular de forma inapropiada en el 50% de los tumores humanos, los cuales carecen de una p53 funcional y así podría contribuir a la inestabilidad genética en general que acompaña a estos tumores.

4.4 LÍNEAS RADIOSENSIBLES COMO HERRAMIENTA FUNDAMENTAL PARA ESTOS ESTUDIOS

Nosotros hemos utilizado líneas celulares de hámster Chino, tanto eficaces en reparación como radiosensibles, para nuestros estudios acerca de la posible relación de las Topoisomerasas con la reparación del daño por radiación ionizante. Otros autores, han estudiado líneas celulares radioresistentes o radiosensibles, fundamentalmente de origen

humano y de roedores, para comprobar su respuesta a la radiación ionizante. Las líneas celulares mutantes son muy valiosas para el estudio de los procesos de reparación y hoy en día hay disponible una serie de líneas que muestran diferente grado de capacidad de reparación y de hipersensibilidad al daño producido por la radiación (Hickson y col., 1990; Collins, 1993; Zdzienicka, 1995).

En cuanto a la elección por nuestra parte de líneas celulares de hámster, hemos de decir que, mientras los experimentos con líneas celulares humanas son directamente más extrapolables a aplicaciones clínicas en radio- o quimioterapia, la disponibilidad de una variedad de líneas celulares de roedores defectuosas en reparación ha hecho de este material una alternativa interesante frente a la utilización de células humanas, en muchos estudios enfocados a averiguar el posible papel de las Topoisomerasas en reparación.

Las DSBs resultan en efectos nocivos y se consideran las lesiones más letales inducidas por la radiación ionizante (Kanaar y col., 1998), por lo tanto no nos debe sorprender que un defecto en la reparación de las DSBs se haya visto asociado en la mayoría de los casos con una sensibilidad a los rayos X o γ en varias líneas mutantes.

Ya que los mecanismos de acción de los venenos de Topo como amsacrina (mAMSA) o epipodofilotoxina (VP16, etopósido; VM26, tenipósido) llevan consigo la estabilización de los complejos de rotura, y por lo tanto, generan roturas de cadena en el ADN, es de esperar que varias líneas celulares de roedores sensibles a la radiación ionizante, la cual genera tanto SSBs y DSBs, sean sensibles igualmente a los venenos de Topoisomerasas, siendo este fenómeno lo que se conoce en general como sensibilidad cruzada (Evans y col., 1989; Davies y col., 1990; Caldecott y col., 1990, 1993). De acuerdo con dichas expectativas, se ha visto que varias líneas celulares radiosensibles de roedores incluyendo BLM-2, XR-1, *xrs* 1, ADR y L5178-S, muestran sensibilidad cruzada a drogas que inhiben la acción de la Topo II (Robson y col., 1987; Evans y col., 1989; Davies y col., 1990). Los venenos de Topo II permiten que dicha enzima corte el ADN de forma normal pero inhiben la reacción en un paso intermediario, previniendo la ligación del ADN, y persistiendo así el ya conocido complejo de rotura.

En general, es interesante señalar que los mutantes radiosensibles muestran igual o incluso una mayor sensibilidad a los venenos de Topo II que a los rayos X. Parece que existe una relación directa entre el nivel nuclear de la Topo II y la sensibilidad celular a los venenos de Topoisomerasa II (Davies y col., 1988). Sin embargo, cambios en los niveles de Topoisomerasas no parecen alterar la sensibilidad a los rayos X *per se*.

En nuestra opinión, una razón subyacente para esta común asociación entre sensibilidad a los rayos X e igualmente a los inhibidores de Topo II podría implicar uno de varios mecanismos. Entre los más probables podríamos proponer que la Topo II jugase un papel en la reparación del daño en el ADN inducido por rayos X o por otros agentes que provoquen rotura en el ADN. Muchos procedimientos en el metabolismo del ADN que implican corte, re-síntesis y ligación del ADN requerirán la acción de las Topoisomerasas de ADN para controlar y modificar el grado de superenrollamiento. Sin embargo, todavía no existen evidencias de una participación directa de las Topoisomerasas en alguna forma de reparación del ADN. Otro posible mecanismo es que el daño en el ADN (roturas de cadena) generados por los venenos de Topoisomerasas y por los rayos X se reparen por una ruta común (Hickson y col., 1990), siendo quizás esta la explicación más probable. En particular, parece que determinadas líneas celulares defectuosas en la reparación del ADN acumulan una sub-población de roturas de cadena las cuales persisten por un período anormalmente largo después del tratamiento con inhibidores de Topo II. Estas roturas de cadena podrían resultar de la acción de la Topo II y permanecer sin reparar debido al defecto en la reunión de las roturas de cadena en estos mutantes. Por otra parte, otra posible explicación sería que dichas roturas de cadena podrían incrementarse por un mecanismo independiente de la Topo II, como pudiera ser por la formación de radicales libres, un efecto conocido del VP-16 y de otros inhibidores de Topo II. Obviamente, esto sigue siendo una cuestión aún abierta, y se necesitan más resultados para demostrar cual de las dos hipótesis propuestas podría ser la correcta.

4.5 INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS COMO POSIBLE ALTERNATIVA

Con el objetivo de esclarecer las bases moleculares sobre la posible implicación de las Topoisomerasas en la reparación del ADN, se han llevado a cabo numerosos estudios comparativos en los cuales se ha investigado los procesos de reparación en presencia y ausencia de inhibidores de Topoisomerasas.

El uso de los clásicos venenos de Topoisomerasas en combinación con radioterapia o con tratamiento con drogas usadas en quimioterapia, se ha considerado de gran interés para posibles aplicaciones clínicas (Carmichael y Hickson, 1991; Slichenmyer y col., 1993). Se ha encontrado que la CPT, el topotecán y la beta-lapachona, a pesar de sus efectos diversos, potencian la citotoxicidad de agentes que dañan el ADN como el MMS (Boorstein y Pardee, 1984), neocarzinostatina (Li y Pardee, 1992) y los rayos X (Mattern y col., 1991; de Salvia y col., 1991; Boothman y col., 1992; Kim y col., 1992).

El inconveniente de estos venenos inhibidores de Topoisomerasas es que llevan a la estabilización del complejo de rotura ADN-Topoisomerasa provocando ellos mismos roturas de cadena, que vendrían a añadirse a las provocadas por el agente genotóxico de modo que ésto no constituye una prueba limpia para determinar la posible implicación de las Topoisomerasas en la reparación del daño provocado por agentes físicos o químicos.

Más recientemente se está estudiando una nueva generación de verdaderos inhibidores catalíticos de Topoisomerasa II, como suramin (Funayama y col., 1993; Lopez y col., 1994; Lelièvre y col., 1995), aclarubicina (Sørensen y col., 1992), merbarona (Drake y col., 1989a), e ICRF-193 (Hamatake y col., 1997), los cuales no estabilizan los complejos de rotura. Ellos nos proporcionan un prometedor campo para llevar a cabo nuevos estudios sobre la posible influencia de la modulación de las Topoisomerasas tras el tratamiento con agentes físicos o químicos capaces de inducir lesiones en el ADN, las cuales tienen que ser reparadas para mantener la estabilidad genética.

En el presente trabajo y con la finalidad última de aportar resultados que nos ayudasen a esclarecer esta cuestión, elegimos los inhibidores de Topo II bufalin e ICRF-193 porque según las publicaciones recientes al respecto parecían los más prometedores. Se llevaron a cabo, en primer lugar, experimentos para comprobar su posible genotoxicidad, ya que estábamos buscando el inhibidor catalítico ideal, es decir, que inhibiera a la enzima de manera independiente a la estabilización del complejo de rotura, y por otra parte era muy importante que el inhibidor no provocase daño en el ADN, ya que queríamos detectar posteriormente una posible disminución del daño producido por radiación, si la hubiera, en presencia de un inhibidor Topo (en este caso Topo II).

Nuestros experimentos demostraron claramente la inhibición de la actividad Topo II tras el tratamiento con estos compuestos (Pastor y col., 2002a), confirmando lo que ya otros autores habían publicado recientemente (Tanabe y col., 1991; Ishida y col., 1991; Hashimoto y col., 1997), aunque los mecanismos de inhibición desarrollados por estos compuestos parecen ser bastante diferentes.

Las interacciones moleculares del ICRF-193, como compuesto representativo de las bisdioxopiperazinas, con la Topo II se han estudiado mucho en los últimos años y se ha llegado a la conclusión de la existencia de una interacción directa entre ambos de forma que la enzima queda atrapada formando un complejo cerrado con el ADN y bloqueando el cambio conformacional que sufre la enzima (Fig. X) (Roca y col., 1994). Aunque las 2,6-dioxopiperazinas no inducen complejos de rotura, se ha planteado que podrían generar roturas en el ADN/roturas cromosómicas como resultado de la interrupción de la

segregación (al igual que ocurría en los mutantes *top2* de *Saccharomyces cerevisiae*). A pesar de todo lo que se ha avanzado estos últimos años en el estudio de estos compuestos, el mecanismo por el cual se produce la inhibición es objeto de controversia y aunque la mayoría de los autores apoyan la idea de que los inhibidores como el ICRF-193 impedirían una apertura de la estructura abrazadera mediante la inhibición de la hidrólisis de ATP (Roca y col., 1994; Morris y col., 2000; Patel y col., 2000), otros estudios apuntan a que estos compuestos estabilizan la forma proteína-ADN mediante un mecanismo independiente de la hidrólisis del ATP (Chang y col., 1998).

Por otra parte y en lo que se refiere al bufalin, se llevaron a cabo experimentos en la línea de leucemia humana HL-60 y se vio que el tratamiento con bufalin 10^{-7} M inducía una disminución muy marcada en la cantidad de Topo II α y II β , así como en la actividad Topo II, la cual se hacía casi imposible de detectar a las 18h después de iniciar el tratamiento. El nivel de ARNm para la Topo II empezaba a disminuir inmediatamente después de empezar el tratamiento con bufalin y ésto se reflejaba en una posterior disminución en el nivel de la proteína Topo II α ; sin embargo los niveles de ARNm no bajaron del 48%, por lo que se piensa que la fuerte disminución de la actividad Topo II se debería además con toda probabilidad a la degradación de la proteína existente por modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación (Nakajima y col., 1995). Sin embargo, cuando se ensayó la actividad Topo II *in vitro* en presencia del inhibidor, no se observó una modulación de la actividad enzimática por el bufalin, por lo que se concluyó que el bufalin causaba una disminución considerable en los niveles normales de ARNm para la Topo II, que conducía a una disminución tanto de la cantidad como de la actividad de la Topo II (Hashimoto y col., 1997).

Como consecuencia de estos resultados, se planteó la hipótesis de si el pretratamiento de células tumorales con bufalin modificaría el efecto producido por el tratamiento con un determinado agente antitumoral. Los resultados fueron muy alentadores, ya que el tratamiento previo de células HL-60 con bufalin potenciaba los efectos negativos del cisplatino y de RA (“all-trans” ácido retinoico) aumentando los niveles de muerte celular (Hashimoto y col., 1997). Estas observaciones sugieren, con las debidas cautelas, que una combinación de drogas anticancer y de compuestos que disminuyen los niveles o la actividad de Topo II podría ser una estrategia muy útil en clínica para la quimioterapia del cáncer.

Por nuestra parte, con objeto de analizar las características que los inhibidores catalíticos de Topoisomerasas debían cumplir para poder avanzar en nuestras

investigaciones, se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de comprobar el posible efecto citotóxico y genotóxico de estos compuestos (Pastor y col., 2002a). En lo que se refiere a estos parámetros, nuestros resultados muestran un efecto negativo tanto del bufalin como del ICRF-193 en el crecimiento celular, lo cual en principio parece apoyar la posible utilidad de estos compuestos en la terapia del cáncer. Si comparamos la efectividad relativa del ICRF-193 o del bufalin en las líneas celulares AA8 (parental) y EM9 (mutante deficiente en reparación) se observa que estas últimas parecen ser más resistentes al ICRF-193 que la línea AA8, mientras que no se observan diferencias entre ambas líneas celulares en su respuesta al tratamiento con bufalin.

En nuestra opinión la diferente respuesta que muestran las líneas AA8 y EM9 al tratamiento con ICRF-193 medido por crecimiento celular merece ser discutida. Como posibles explicaciones habríamos de tener en cuenta que el ciclo celular para la línea AA8 es de unas 12 h frente al tiempo de ciclo para la línea EM9 que es de unas 16 h (como ya observamos mediante los análisis de citometría de flujo); que el ICRF-193 aún siendo un inhibidor que no actúa mediante la estabilización del complejo de rotura, provoca daño en el ADN, con lo cual, la respuesta al daño producida por el ICRF-193 va a ser más tardía, a un tiempo determinado, en la línea EM9 que en la línea AA8 y, que el efecto seguramente sería comparable al observado para la línea parental si dejásemos pasar más tiempo en la línea mutante que en la línea parental. De hecho, pudimos ver que a concentraciones superiores del compuesto esta diferencia no se observa, ya que el daño es muy alto en ambas. Es importante tener en cuenta a la hora de interpretar estos resultados que el ensayo de la SRB, elegido por nosotros como test de citotoxicidad, nos está midiendo densidad celular a través de la absorbancia de su contenido proteico y que este colorante solo es capaz de penetrar en las células vivas, excluyendo así de la población a las células muertas.

Los resultados obtenidos por nosotros para el bufalin, sin embargo, son comparables para las dos líneas celulares, ya que este compuesto no provoca daño en el ADN, como vimos posteriormente mediante el test de aberraciones cromosómicas y en ensayo del cometa. Una explicación probable sería que dado que el tratamiento con bufalin provoca un descenso drástico de la actividad Topo II como consecuencia de una disminución de la cantidad de enzima Topo II (Hashimoto y col., 1997), las células en esta situación desencadenarían la parada del ciclo en G2/M (Jing y col., 1994b) y, a partir de este momento se podría disparar el mecanismo de la muerte celular por apoptosis (Masuda y col., 1995; Watabe y col., 1996; 1997; Kawazoe y col., 1999a).

En cuanto al posible daño en el ADN provocado por estos inhibidores, como observamos en nuestros resultados obtenidos mediante el ensayo del cometa, existe una respuesta dosis-dependiente para el ICRF-193, tanto en la línea AA8 como en la EM9, siendo esta última más sensible al daño que la línea parental. Estos resultados para el ICRF-193 contrastan claramente con los resultados obtenidos para el bufalin, en los que no se observaron diferencias entre las células controles y las tratadas con este compuesto, no apreciándose daño alguno en el ADN, de forma similar en las dos líneas celulares. En nuestra opinión, este resultado sería el esperado teniendo en cuenta que el bufalin no ejerce una interacción directa con la Topo II, como se comprobó al realizar los ensayos de actividad Topo II *in vitro*. Como ya comentamos anteriormente, el ICRF-193 estabiliza a la enzima una vez se ha unido al ADN formando un complejo ADN-proteína cerrado (Roca y col., 1994), y según esto no esperaríamos encontrar daño en el ADN tras el tratamiento con este compuesto. Una posible explicación podría ser que la maquinaria de reparación identificase dicho complejo como una estructura voluminosa y actuase eliminando esta anomalía mediante una acción endonucleotídica, que finalmente podría desencadenar apoptosis.

En concordancia con estos resultados, nuestros análisis de citogenética nos han mostrado al ICRF-193 como un agente clastogénico bastante activo, cuyo efecto es dosis-dependiente, en AA8 y EM9, siendo éstas últimas más sensibles al tratamiento, como era de esperar debido al defecto en reparación de esta línea mutante (Thompson y col., 1982). Por el contrario, el tratamiento con bufalin no provocó daño cromosómico (Pastor y col., 2002a). Estos resultados eran asimismo los que cabría esperar teniendo en cuenta los mecanismos por los cuales se lleva en este caso a cabo la inhibición de la enzima. Nuestros resultados, por otra parte, están de acuerdo con los de Ikushima y col. (1998) los cuales igualmente observaron una elevada frecuencia de aberraciones de tipo cromatídico y cromosómico tras el tratamiento con ICRF-193 en la línea celular V79.

Debido a que la Topo II es esencial para la correcta segregación de los cromosomas durante mitosis, no sólo en levaduras (Uemura y col., 1987) sino también en *Drosophila* (Buchenau y col., 1993), anfibios (Shamu y Murray, 1992) y mamíferos (Downes y col., 1991; Sumner, 1995; 1998), analizamos también la posibilidad de que la inhibición de esta enzima pudiese afectar en este sentido de forma desigual a la línea mutante y parental.

Cuando iniciamos nuestros análisis para la detección de células endorreduplicadas en presencia y ausencia de estos compuestos observamos el hecho ya publicado en nuestro laboratorio (Cortés y col., 1993) de que la línea mutante EM9, en ausencia de tratamiento

presentase una elevada tasa de células endorreduplicadas observadas en metafase, a diferencia de la línea parental AA8.

Podríamos pensar que, en la línea mutante EM9, o bien bajos niveles de la enzima Topo II, o una forma modificada de la misma, que podría resultar en una peor actividad para llevar a cabo una correcta separación de las cromátidas hermanas, sería responsable de las diferencias encontradas entre ambas líneas celulares en cuanto al nivel de células endorreduplicadas en ausencia de tratamiento. En primer lugar, hay que señalar que nuestros análisis de cuantificación de enzima Topo II no mostraban diferencias en cuanto al nivel de expresión de la enzima, así que según este resultado podríamos descartar la primera hipótesis, con lo que en principio parece más probable que la línea EM9 posea una Topo II modificada que podría resultar en una disminuída o peor función de segregación de los cromosomas en mitosis. No obstante, esto no deja de ser meramente especulativo y necesitaría ser demostrado.

En nuestra opinión otra posible explicación alternativa podría ser la existencia de diferencias en cuanto a la estructura de la cromatina entre estas dos líneas celulares, de forma que se dificultase, a la enzima Topo II de la línea EM9, la cual sería a cualquier efecto normal, llevar a cabo de forma correcta la segregación de sus cromosomas.

Por otra parte, en lo que se refiere a los inhibidores usados por nosotros hemos podido observar que mediante el tratamiento con ICRF-193 se indujo la producción de células endorreduplicadas, tanto en la línea parental como en la mutante Pastor y col., 2002b). En este caso sí podemos concluir que la formación de células endorreduplicadas se debe con toda probabilidad a una disminución en la actividad Topo II, siendo nuestro resultado una prueba importante y concluyente de que la enzima Topo II es esencial para la segregación de los cromosomas en mitosis.

Una observación de especial importancia fué que el tratamiento con ICRF-193 aumentaba en más del 50 % el número de células endorreduplicadas en la línea mutante en comparación con la línea parental. Dado que, según comprobamos, ambas líneas celulares presentaban niveles equiparables de enzima Topo II, una posible explicación de tan elevado número de células endorreduplicadas inducido por el ICRF-193 en la línea EM9 podría deberse a que la Topo II en esta línea celular fuese más sensible al ICRF-193 que la Topo II de la línea parental. Sin embargo, hasta el momento no podemos descartar que, tal como señalamos anteriormente, posibles diferencias en la estructura de la cromatina entre ambas líneas celulares pudieran ser responsables tanto del anormal nivel basal de

endorreduplicadas encontrado en la línea mutante, como del incremento tan elevado de células endorreduplicadas inducidas por el inhibidor de Topo II ICRF-193.

A la vista de nuestros resultados, resulta evidente que la utilización de los inhibidores catalíticos de Topo II puede ser una nueva y prometedora herramienta para descubrir muchos aspectos mecánicos y fisiológicos del tan complejo y aún oscuro fenómeno de la endorreduplicación cromosómica.

Centrándonos en el caso del bufalin, por otra parte, no hemos observado aumento alguno en la producción de células endorreduplicadas y esto a nuestro juicio se puede explicar en base al mecanismo de inhibición de la enzima por medio del cual el compuesto actúa. Una consideración a tener en cuenta, en primer lugar, es que fueron necesarias 22 horas de tratamiento para que consiguiéramos detectar inhibición enzimática. Esto es una lógica consecuencia de que la inhibición existente no es directa, a diferencia del ICRF-193, con el que obtuvimos inhibición de la actividad Topo II con sólo 3 horas de tratamiento. En el caso del bufalin, y debido a ese largo período de tiempo en presencia del compuesto, es de esperar que las células se vayan parando en uno de los puntos de control del ciclo celular, sin ser capaces de iniciar una nueva ronda a lo largo del ciclo; a diferencia del tratamiento con el ICRF-193, en cuyo caso una vez transcurridas las 3 horas se suspendió el tratamiento y se permitió que las células continuasen su recorrido por el ciclo celular. Durante el tratamiento con el ICRF-193, de acuerdo con lo que se ha publicado (Ishida y col., 1994, las células que tuviesen que pasar por mitosis han debido tener serios problemas para llevar a cabo la correcta segregación de los cromosomas. Con toda probabilidad, cuando se eliminó el tratamiento, muchas de estas células con los cromosomas no segregados entraron en la fase S replicando su ADN y apareciendo los típicos cromosomas formados por cuatro cromátidas (diplocromosomas) que nosotros observamos posteriormente cuando alcanzan de nuevo la fase de mitosis.

Resumiendo un poco estos últimos estudios comparativos de los dos compuestos elegidos, podemos decir que tanto el ICRF-193 como el bufalin son eficientes en provocar la inhibición de la enzima Topo II y, aunque sus mecanismos de acción son bastante diferentes, en ningún caso la inhibición de la enzima actúa mediante la estabilización del complejo de rotura, por lo que no se pueden considerar venenos de Topo II. Sin embargo, hemos visto que el compuesto ICRF-193 provoca daño en el ADN, a diferencia del bufalin, y aunque se desconoce aún cual es el mecanismo por el cual se produce este daño, se podría deber a la interferencia de la estructura voluminosa que formaría la Topo II bloqueada, unida al ADN en un complejo cerrado, de manera parecida a una abrazadera,

con la maquinaria de reparación o de transcripción, o incluso con la reparación del ADN o con el ensamblaje y desensamblaje de la cromatina (Domínguez y col., 2001; Jensen y col., 2000). Este efecto clastogénico parece ser el responsable del descenso de la población mitótica que observamos a concentraciones elevadas de este compuesto y que nos impiden la cuantificación tanto de aberraciones cromosómicas como de células endorreduplicadas.

Como consecuencia de estos resultados, teniendo en cuenta que el ICRF-193 provoca daño en el ADN de manera similar a los verdaderos venenos de Topo II, tuvimos que descartarlo y quedarnos exclusivamente con el bufalin, para poder llevar a cabo los últimos experimentos propuestos y que nos determinarían si la inhibición de la Topo II podría modificar de algún modo la reparación del daño en el ADN, en este caso provocada por rayos X.

Con esta finalidad se llevaron a cabo nuestros estudios de daño en el ADN mediante la utilización del ensayo del cometa en los que se comparó la cinética de reparación en células AA8 y EM9 tanto en ausencia como en presencia de bufalin, o lo que es lo mismo con la Topo II inhibida.

Los resultados que obtuvimos tras realizar estos estudios son a nuestro juicio muy interesantes, ya que apoyan la hipótesis inicialmente propuesta de que la Topo II estaría implicada en reparación, ya que en presencia del inhibidos de la enzima bufalin la cinética de reparación del daño en el ADN, provocado con la irradiación de 5 Gy de rayos X, fue más lenta en las dos líneas celulares estudiadas que la observada en ausencia de inhibición de la Topo II.

Estos resultados son una prueba más que añadir a las evidencias que implicarían a las Topoisomerasas de ADN en la reparación del daño en el ADN, si bien es cierto que necesitamos pruebas más directas que confirmen estos resultados. En este sentido, la búsqueda de inhibidores catalíticos verdaderos, que no provoquen daño en el ADN debe continuar, ya que serían una herramienta muy útil e incluso necesaria para poder avanzar en este tipo de estudios.

Aunque se han publicado resultados contradictorios, el cuerpo principal de evidencias con respecto a las actividades Topoisomerasas y los niveles de expresión, después de dañarse el ADN, así como el sinergismo existente entre agentes que dañan el ADN y los venenos de las Topoisomerasas, parecen apoyar la hipótesis de la implicación de las Topoisomerasas en la reparación del ADN. Ciertamente, las actividades Topoisomerasas y la expresión enzimática dependen de la fase del ciclo celular y del estado proliferativo en el que las células se encuentren, refiriéndonos principalmente a la

Topo II. Así, el uso de cultivos sincrónicos, como los empleados por nosotros, se presenta como una alternativa interesante para el estudio de una posible relación entre Topoisomerasas y la reparación del ADN.

Se han propuesto, por otra parte, que la participación activa de las Topoisomerasas sería esencial para llevar a cabo la relajación de la cromatina, la cual facilitaría una mayor accesibilidad de las enzimas de reparación al ADN dañado. De esta forma las Topoisomerasas actuarían en una fase preparatoria y previa a la reparación sin desempeñar en realidad un papel directo en la reparación como tal.

Por otra parte, no debemos olvidar que una hipótesis alternativa en absoluto descartada es que estas enzimas nucleares jueguen un papel directo en la reparación, ya que estas enzimas son candidatas para poder explicar los mecanismos moleculares, todavía desconocidos, que dan lugar a la formación de los intercambios entre cromátidas hermanas (Painter, 1980; Cleaver, 1981). La implicación de las Topoisomerasas en la reparación (directa o indirectamente) es en cualquier caso aún hoy en día una cuestión por resolver.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir de los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral podemos concluir que:

1. Existe una modulación de la actividad Topo I y Topo II como consecuencia del daño en el ADN producido por rayos X. Estas variaciones son diferentes en las líneas parentales en comparación con las líneas mutantes correspondientes.
2. Las variaciones de las actividades Topoisomerasas no se corresponden con variaciones de la cantidad de la enzima, sino que se debe a modificaciones postraduccionales más que a la síntesis de nueva proteína y a la focalización de la enzima existente.
3. El ICRF-193 no es un inhibidor catalítico limpio de la Topo II como se describió en un principio, sino que es capaz de provocar daño en el ADN, muerte celular y endoreduplicación cromosómica mediante mecanismos aún desconocidos.
4. El bufalin, aún no siendo un inhibidor catalítico como tal, provoca la inhibición de la enzima sin desencadenar daño en el ADN.
5. Existe una modulación de la reparación del daño en el ADN provocado por los rayos X en presencia del inhibidor bufalin, o lo que es lo mismo, la inhibición de la Topo II alarga/ aumenta el tiempo de reparación necesario para un daño inicial equiparable.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, N.; Kobayashi, M. y Koyama, H. (1997) Cell cycle-dependent regulation of the mouse DNA topoisomerase II alpha gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 105-109.
- Adachi, Y.; Luke, M. y Laemmli, U.K. (1991) Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* 64, 137-148.
- Adlakha, R.C. y Rao, P.N. (1986) Molecular mechanisms of the chromosome condensation and decondensation cycle in mammalian cells. *Bioessays* 5,100-105.
- Anderson, C.W. y Carter, T.H. (1996) The DNA-activated protein kinase - DNA-PK. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 217, 91-111.
- Andoh, T. (1998) Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs. *Biochimie* 80, 235-246.
- Andoh, T. e Ishida, R. (1998) Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400,155-171.
- Bae, Y.S.; Kawasaki, I.; Ikeda, H. y Liu, L.F. (1988) Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2076-2080.
- Barrows, L.R.; Holden, J.A.; Anderson, M. y D'Arpa P. (1998) The CHO XRCC1 mutant, EM9, deficient in DNA ligase III activity, exhibits hypersensitivity to camptothecin independent of DNA replication. *Mutat. Res.* 408, 103-110.
- Barry, M.A.; Behnke, C.A. y Eastman, A. (1993) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2353-2362.
- Bauer, W.R. (1978) Structure and reactions of closed duplex DNA. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 7, 287-313.
- Beck, W.T y Danks, M.K. (1991) Multidrug resistance associated with alterations in topoisomerase II. *In: DNA Topoisomerases in Cancer* (Potmesil M, Kohn K, eds) Oxford Univ. Press, New York, 260-275.
- Bennett, R.J.; Noirot-Gros, M.F.; Wang, J.C. (2000) Interaction between yeast sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* 275, 26898-26905.
- Berrios, M.; Osheroff, N. y Fisher, P.A. (1985) In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 4142-4146.
- Bertrand, R.; Solary, E.; Jenkins, J. y Pommier, Y.(1993) Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp. Cell Res.* 207, 388-397.
- Biedermann, K.A.; Sun, J.; Giaccia, A.J.; Tosto, L.M. y Brown, J.M. (1991) Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1394-1397.
- Bohr, V.R.; Smith, C.R.; Okumot, D.S. y Hanawalt, P.C. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40, 359-369.
- Bojanowski, K.; Lelièvre, S.; Markovits, J.; Couprie, J.; Jacquemin-Sablon, A.y Larsen, A.K. (1992) Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3025-3029.

- Boles, T.C.; White, J.H. y Cozzarelli, N.R. (1990) Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 213, 931-951.
- Boorstein, R.J. y Pardee, A.B. (1984) Beta-lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 828-834.
- Boothman, D.A.; Fukunaga, N. y Wang, M. (1994) Down-regulation of topoisomerase I in mammalian cells following ionizing radiation. *Cancer Res.* 54, 4618-4626.
- Boothman, D.A.; Wang, M.; Schea, R.A.; Burrows, H.L.; Strickfaden, S. y Owens, J.K. (1992) Posttreatment exposure to camptothecin enhances the lethal effects of x-rays on radioresistant human malignant melanoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24, 939-948.
- Boritzki, T.J.; Wolfard, T.S.; Besserer, J.A.; Jackson, R.C. y Fry, D.W. (1988) Inhibition of type II topoisomerase by fostriecin. *Biochem. Pharmacol.* 37, 4063-4068.
- Bosma, G.C.J.; Custer, R.P. y Bosma, M.J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527-530.
- Botchan, P.; Wang, J.C. y Echols H. (1973) Effect of circularity and superhelicity on transcription from bacteriophagelambda DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 70, 3077-3081.
- Boulton, S.J. y Jackson, S.P. (1998) Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* 17, 1819-1828.
- Brill, S.J.; DiNardo, S.; Voelkel-Meiman, K. y Sternglanz, R. (1987) Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326, 414-416.
- Bryant, P.E. y Ritches, A.C. (1989) Oncogenic transformation of murine C3H10T1/2 cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. *Br. J. Cancer* 60, 852-854.
- Bryant, P.E.; Jones, N.J. y Liu, N. (1993) Radiosensitive Chinese hamster irs2 cells show enhanced chromosomal sensitivity to ionizing radiation and restriction endonuclease induced blunt-ended double-strand breaks. *Mutagenesis* 8, 141-147.
- Buchenau, P.; Saumweber, H. y Arndt-Jovin, D.J. (1993) Consequences of topoisomerase II inhibition in early embryogenesis of Drosophila revealed by in vivo confocal laser scanning microscopy. *J. Cell Sci.* 104, 1175-1185.
- Bullock, P.; Champoux, J.J. y Botchan, M. (1985) Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. *Science* 230, 954-958.
- Caldecott, K.; Banks, G. y Jeggo, P. (1990) DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res.* 50, 5778-5783.
- Caldecott, K.; Banks, G. y Jeggo, P. (1993) The induction and reversal of topoisomerase II cleavable complexes formed by nuclear extract from the CHO DNA repair mutant, xrs1. *Mutat. Res.* 293, 259-267.
- Caldecott, K.W.; McKeown, C.K.; Tucker, J.D.; Ljungquist, S. y Thompson, L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell. Biol.* 14, 68-76.
- Caldecott, K.W.; Tucker, J.D.; Stanker, L.H. y Thompson, L.H. (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acid Res.* 23, 4836-4843.

- Canman, C.E.; Lim, D.S.; Cimprich, K.A.; Taya, Y.; Tamai, K.; Sakaguchi, K.; Apella, E.; Kastan, M.B. y Siliciano, J.D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- Capranico, G. y Zunino, F. (1992) DNA topoisomerase-trapping antitumour drugs. *Eur. J. Cancer* 28, 2055-2060.
- Cardellini, E. y Durban, E. (1993) Phosphorylation of human topoisomerase I by protein kinase C in vitro and in phorbol 12-myristate 13-acetate-activated HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Biochem. J.* 291, 303-307.
- Cardenas, M.E. y Gasser, S.M. (1993) Regulation of topoisomerase II by phosphorylation: a role for casein kinase II. *J. Cell Sci.* 104, 219-225.
- Carmichael, J. y Hickson, I.D. (1991) Keynote address: mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 197-202.
- Caron, P.R.; Watt, P. y Wang, J.C. (1994) The C-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3197-3207. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 950-954.
- Carroll, D.; Wright, S.H.; Wolff, R.K.; Grzesiuk, E. y Mayron, E. (1986) Efficient homologous recombination of linear DNA substrates after injection into *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell Biol.* 6, 2053-2961.
- Champoux, J.J. y Dulbecco, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 143-146.
- Chan, D.W. y Lees-Miller, S.P. (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 8936-8941.
- Chang, S.; Hu, T. y Hsieh, T.S. (1998) Analysis of a core domain in *Drosophila* DNA topoisomerase II. Targeting of an antitumor agent ICRF-159. *J. Biol. Chem.* 273, 19822-19828.
- Chen, A.Y. y Liu, L.F. (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 191-218.
- Chen, C. y Kolodner, R.D. (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature Genet.* 23, 81-85.
- Chen, M. y Beck, W.T. (1993) Teniposide-resistant CEM cells, which express mutant DNA topoisomerase II alpha, when treated with non-complex-stabilizing inhibitors of the enzyme, display no cross-resistance and reveal aberrant functions of the mutant enzyme. *Cancer Res.* 53, 5946-5953.
- Cleaver, J.E. (1981) Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. *Exp. Cell Res.* 136, 27-30.
- Cleaver, J.E. (1982) Specificity and completeness of inhibition of DNA repair by novobiocin and aphidicolin. *Carcinogenesis* 3, 1171-1174.
- Cline, S.D.; Macdonald, T.L. y Osheroff, N. (1997) Azatoxin is a mechanistic hybrid of the topoisomerase II-targeted anticancer drugs etoposide and ellipticine. *Biochemistry* 36, 13095-13110.
- Cockerill, P.N. y Garrard, W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett.* 204, 5-7.

- Collins, A.R. (1993) Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics. *Mutat. Res.* 293, 99-118.
- Collins, A.R.S. y Johnson, R.T. (1979) Novobiocin: an inhibitor of the repair of UV-induced but not X-ray-induced damage in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 7, 1311-1320.
- Collins, A.R.S.; Downes, C.S. y Johnson, R.T. (1980). Cell cycle-related variations in UV damage and repair capacity in Chinese hamster (CHO-K1) cells. *J. Cell Physiol.* 103, 179-191.
- Corbett, A.H. y Osheroff, N. (1993) When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 585-597.
- Cortés, F. y Pastor, N. (2001,a) DNA topoisomerasas in cancer chemotherapy: basic and applied aspects. *Cytobios* 106, 217-227.
- Cortés, F. y Pastor, N. (2001,b) Ionizing radiation damage repair: a role for topoisomerases? *Mutagenesis* 16, 365-368.
- Cortés, F.; Mateos, S. y Escalza, P. (1987) Acetaldehyde induces mature endoreduplicated *Allium cepa* root tip cells to divide. *Experientia* 43, 205-206.
- Cortés, F.; Piñero, J. y Palitti, F. (1993) Cytogenetic effects of inhibition of topoisomerase I or II activities in the CHO mutant EM9 and its parental line AA8. *Mutat. Res.* 288, 281-289.
- Cozzarelli, N.R. y Wang, J.C., eds. "DNA Topology and its Biological Effects". Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990.
- Creighton, A.M.; Hellmann, K. y Whitecross, S. (1969) Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature* 222, 384-385.
- Cunningham, J.M.; Francis, G.E.; Holland, M.J.; Pirolo, K.F. y Chang, E.H. (1991) Aberrant DNA topoisomerase II activity, radioresistance and inherited susceptibility to cancer. *Br. J. Cancer* 63, 29-36.
- Darby, M.K.; Schmitt, B.; Jongstra-Bilen, J. y Vosberg, H.P. (1985) Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly(ADP-ribosylation). *EMBO J.* 4, 2129-2134.
- D'Arpa, P. y Liu, L.F. (1989) Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochim. Biophys. Acta* 989, 163-177.
- Davies, J.M.S.; Lowry, C.V. y Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1-6.
- Davies, S.M.; Davies, S.L.; Hall, A.G. y Hickson, I.D. (1990) Isolation and partial characterisation of a mammalian cell mutant hypersensitive to topoisomerase II inhibitors and X-rays. *Mutat. Res.* 235, 111-118.
- Davies, S.M.; Robson, C.N.; Davies, S.L. y Hickson, I.D. (1988) Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J. Biol. Chem.* 263, 17724-17729.
- De Salvia, R.; Degradi, F.; Berghella, L. y Fiore, M. (1991) Effects of topoisomerase I inhibition or activation on X-ray-induced chromosomal aberrations. 21nd Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, 25-31 August, Abstracts Book, pp 1-11, (EEMS, Prague).
- Debenham, P.G.; Jones, N.J. y Webb, M.B.T. (1988) Vector-mediated DNA double-strand break analysis in normal and radiation-sensitive Chinese hamster wild-type cells. *Mutat. Res.* 199, 1-9.
- Di Mauro, E.; Camilloni, G.; Verdona, L. y Caserta, M. (1993) DNA topoisomerase I controls the kinetics of promoter activation and DNA topology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6702-6710.

- Dillehay, L.E.; Jacobson-Kram, D. y Williams, J.R. (1989) DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 215, 15-23.
- DiNardo, S.; Voelkel, K. y Sternglanz, R. (1984) DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81, 2616-2620.
- Dominguez, I.; Pastor, N.; Mateos, S. y Cortés, F. (2001) Testing the SCE mechanism with non-poisoning topoisomerase II inhibitors. *Mutat. Res.* 497, 71-79.
- Downes, C.S.; Clarke, D.J.; Mullinger, A.M.; Gimenez-Abian, J.F.; Creighton, A.M. y Johnson, R.T. (1994) A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* 372, 467-470.
- Downes, C.S.; Mullinger, A.M. y Johnson, R.T. (1991) Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 8895-8899.
- Downes, C.S.; Ord, M.J.; Mullinger, A.M.; Collins, A.R.S. y Johnson, R.T. (1985) Novobiocin inhibition of DNA excision repair may occur through effects on mitochondrial structure and ATP metabolism, not on repair topoisomerases. *Carcinogenesis* 6, 1343-1352.
- Drake, F.H.; Hofmann, G.A.; Bartus, H.F.; Mattern, M.R.; Crooke, S.T. y Mirabelli, C.K. (1989b) Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 28, 8154-8160.
- Drake, F.H.; Hofmann, G.A.; Mong, S.M.; Bartus, J.O.; Hertzberg, R.P.; Johnson, R.K.; Mattern, M.R. y Mirabelli, C.K. (1989a) In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Res.* 49, 2578-2583.
- Drake, F.H.; Zimmerman, J.P.; McCabe, F.L.; Bartus, H.F.; Per, S.R.; Sullivan, D.M.; Ross, W.E.; Mattern, M.R.; Johnson, R.K.; Crooke, S.T.; y Mirabelli, C.K. (1987) Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 262, 16739-16747.
- Dresler, S.L. y Lieberman, M.W. (1983) Requirement of ATP for specific incision of ultraviolet-damaged DNA during excision repair in permeable human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258, 12269-12273.
- Duguet, M.; Lavenot, C.; Harper, F.; Mirambeau, G. y De Recondo, A.M. (1983) DNA topoisomerases from rat liver: physiological variations. *Nucleic Acids Res.* 11, 1059-1075.
- Earnshaw, W.C. y Heck, M.M. (1985) Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 100, 1716-1725.
- Earnshaw, W.C.; Halligan, B.; Cooke, C.A.; Heck, M.M. y Liu, L.F. (1985) Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 100, 1706-1715.
- Eder, J.P. Jr; Chan, V.T.; Ng, S.W.; Rizvi, N.A.; Zacharoulis, S.; Teicher, B.A. y Schnipper, L.E. (1995) DNA topoisomerase II alpha expression is associated with alkylating agent resistance. *Cancer Res.* 55, 6109-6111.
- Egyhazi, E. y Durban, E. (1987) Microinjection of anti-topoisomerase I immunoglobulin G into nuclei of *Chironomus tentans* salivary gland cells leads to blockage of transcription elongation. *Mol. Cell Biol.* 7, 4308-4316.

- Elia, M.C. y Bradley, M.O. (1992) Influence of chromatin structure on the induction of double strand breaks by ionizing radiation. *Cancer Res.* 52, 1580-1586.
- Evans, H.H.; Ricanati, M.; Horng, M.F. y Mencl, J. (1989) Relationship between topoisomerase II and radiosensitivity in mouse L5178Y lymphoma strains. *Mutat. Res.* 217, 53-63.
- Fairbairn, D.W.; Olive, P.L. y O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Featherstone, C. y Jackson, S.P. (1999) DNA repair: Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat. Res.* 434, 3-15.
- Ferro, A.M. y Olivera, B.M. (1984) Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 259, 547-554.
- Fleischmann, G.; Pflugfelder, G.; Steiner, E.K.; Javaherian, K.; Howard, G.C.; Wang, J.C. y Elgin, S.C. (1984) Drosophila DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6958-6962.
- Fortune J.M. y Osheroff, N. (2000) Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 221-253.
- Frankenberg-Schwager, M. y Frankenberg, D. (1990) DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int. J. Radiat. Biol.* 58, 569-575.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Froelich-Ammon, S.J.; Patchan, M.W.; Osheroff, N. y Thompson, R.B. (1995) Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 270, 14998-15004.
- Fuller, L.F. y Painter, R.B. (1988) A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat. Res.* 193, 109-121.
- Fulop, G.M. y Phillips, R.A. (1990) The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347, 479-482.
- Funayama, Y.; Nishio, K.; Takeda, Y.; Kubota, N.; Ohira, T.; Ohmori, T.; Ohta, S.; Ogasawara, H.; Hasegawa, S. y Saijo, N. (1993) Suramin inhibits the phosphorylation and catalytic activity of DNA topoisomerase II in human lung cancer cells. *Anticancer Res.* 13, 1981-1988.
- Gaffney, D.K.; Lundquist, M.; Warters, R.L. y Rosley, R. (2000) Effects of modifying topoisomerase II levels on cellular recovery from radiation damage. *Radiat. Res.* 154, 461-466.
- Gale, K.C. y Osheroff, N. (1992) Intrinsic intermolecular DNA ligation activity of eukaryotic topoisomerase II. Potential roles in recombination. *J. Biol. Chem.* 267, 12090-12097.
- Gallagher, M.; Weinberg, R. y Simpson, M.V. (1986) Effect of the bacterial gyrase inhibitors novobiocin, nalidixic acid and oxolinic acid on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 261, 8604-8607.
- Game, J. (1993) DNA double-strand breaks and the RAD50-RAD57 genes in *Saccharomyces*. *Semin. Cancer Biol.* 4, 73-83.

- Gangloff, S.; McDonald, J.P.; Bendixen, C.; Arthur, L. y Rothstein, R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol. Cell Biol.* 14, 8391-8398.
- Gasser, S.M. y Laemmli, U.K. (1986) The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5, 511-518.
- Gasser, S.M. y Laemmli, U.K. (1987) Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp. Cell Res.* 173, 85-98.
- Gasser, S.M.; Laroche, T.; Falquet, J.; Boy de la Tour, E. y Laemmli, U.K. (1986) Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J. Mol. Biol.* 188, 613-629.
- Gellert, M. (1981) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 879-910.
- Gellert, M. (1992) V(D)J recombination gets a break. *Trends Genet.* 8, 408-412.
- Gobert, C.; Bracco, L.; Rossi, F.; Olivier, M.; Tazi, J.; Lavelle, F.; Larsen, A.K. y Riou, J.F. (1996) Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry* 35, 5778-5786.
- Goswami, P.C.; Roti Roti, J.L. y Hunt, C.R. (1996) The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol. Cell Biol.* 16, 1500-1508.
- Goto, T. y Wang, J.C. (1984) Yeast DNA topoisomerase II is encoded by a single-copy, essential gene. *Cell* 36, 1073-1080.
- Haber, J.E. y Leung, W.Y. (1996) Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13949-13954.
- Halligan, B.D.; Davis, J.L.; Edwards, K.A. y Liu, L.F. (1982) Intra- and intermolecular strand transfer by HeLa DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 257, 3995-4000.
- Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19.
- Hamatake, M.; Andoh, T. y Ishida, R. (1997) Effects of ICRF-193, a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II, on sister chromatid exchange. *Anticancer Drugs* 8, 637-642.
- Hammarsten, O. y Chu, G. (1998) DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 525-530.
- Han, S.Y.; Kim, J.C.; Suh, J.M. and Chung, I.K. (2001) Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2. *FEBS Lett.* 505, 57-62.
- Han, Y.H.; Austin, M.J.; Pommier, Y. y Povirk, L.F. (1993) Small deletion and insertion mutations induced by the topoisomerase II inhibitor teniposide in CHO cells and comparison with sites of drug-stimulated DNA cleavage in vitro. *J. Mol. Biol.* 229, 52-66.
- Hanai, R.; Caron, P.R. y Wang, J.C. (1996) Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3653-3657.
- Hashimoto, S.; Jing, Y.; Kawazoe, N.; Masuda, Y.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. y Nakaya, K. (1997) Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. *Leuk. Res.* 21, 875-883.

- Heartlein, M.W.; Tsuji, H. y Latt, S.A. (1987) 5-Bromodeoxyuridine-dependent increase in sister chromatid exchange formation in Bloom's syndrome is associated with reduction in topoisomerase II activity. *Exp. Cell Res.* 169, 245-254.
- Heck, M.M.; Hittelman, W.N. y Earnshaw, W.C. (1988) Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1086-1090.
- Hellmann, K.; Newton, K.A.; Whitmore, D.N.; Hanham, I.W. y Bond, J.V. (1969) Preliminary clinical assessment of I.C.R.F. 159 in acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br. Med. J.* 1, 822-824.
- Hendrickson, E.A. (1997) Insights from model systems. Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am. J. Hum. Genet.* 61,795-800.
- Hendrickson, E.A.; Qin, X.Q.; Bump, E.A.; Schatz, D.G.; Oettinger, M. y Weaver, D.T. (1991) A link between double-strand break-related repair and V(D)J recombination: the scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4061-4065.
- Henner, W.D.; Grunberg, S.M. y Haseltine, W.A. (1982) Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.* 257, 11750-11754.
- Herman, E.H.; Witiak, D.T.; Hellmann, K. y Waravdekar, V.S. Biological properties of ICRF-159 and related bis(dioxopiperazine) compounds. *In Adv. Pharmacol. Chemother.* Vol 19. Academic Press, New York, 1982, pp. 249-291.
- Herrlich, P.; Ponta, H. y Rahmsdorf, H.J. (1992) DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 119, 187-223.
- Herrlich, P.; Sachsenmaier, C.; Radler-Pohl, A.; Gebel, S.; Blattner, C. y Rahmsdorf, H.J. (1994) The mammalian UV response: mechanism of DNA damage induced gene expression. *Adv. Enzyme Regul.* 34, 381-395.
- Hickson, I.D.; Davies, S.L.; Davies, S.M. y Robson, C.N. (1990) DNA repair in radiation sensitive mutants of mammalian cells: possible involvement of DNA topoisomerases. *Int. J. Radiat. Biol.* 58, 561-568.
- Hoeijmakers, J.H. y Bootsma, D. (1990) Molecular genetics of eukaryotic DNA excision repair. *Cancer Cells* 2, 311-320.
- Hoekstra, M.F. (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell-cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 170-175.
- Holbrook, N.J. y Fornace, A.J. Jr. (1991) Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol.* 3, 825-833.
- Holm, C. (1994) Coming undone: how to untangle a chromosome. *Cell* 77, 955-957.
- Holm, C.; Goto, T.; Wang, J.C. y Botstein, D. (1985) DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.
- Hotoda, N. y Hanai, R. (2000) Characterization of recombinant human DNA topoisomerase IIIalpha activity expressed in yeast. *J. Biochem. (Tokyo)* 127, 1109-1113.
- Hsiang, Y.H.; Hertzberg, R.; Hecht, S. y Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260, 14873-14878.
- Huang, Y.; Chang, C.C. y Trosko, J.E. (1983) Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 43, 1361-1364.

- Ikeda, H. (1986) Bacteriophage T4 DNA topoisomerase mediates illegitimate recombination *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 922-926.
- Ikeda, H.; Aoki, K. y Naito, A. (1982) Illegitimate recombination mediated *in vitro* by DNA gyrase of *Escherichia coli*: structure of recombinant DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3724-3728.
- Ikushima, T.; Shima, Y. y Ishii, Y. (1998) Effects of an inhibitor of topoisomerase II, ICRF-193 on the formation of ultraviolet-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 404, 35-38.
- Iliakis, G. (1991) The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays* 13, 641-648.
- Ishida, R.; Miki, T.; Narita, T.; Yui, R.; Sato, M.; Utsumi, K.R.; Tanabe, K. y Andoh, T. (1991) Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavable complex-forming type inhibitors. *Cancer Res.* 51, 4909-4916.
- Ishida, R.; Sato, M.; Narita, T.; Utsumi, K.R.; Nishimoto, T.; Morita, T.; Nagata, H. y Andoh, T. (1994) Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *J. Cell Biol.* 126, 1341-1351.
- Ishii, K.; Futaki, S.; Uchiyama, H.; Nagasawa, K. y Andoh, T. (1987) Mechanism of inhibition of mammalian DNA topoisomerase I by heparin. *Biochem. J.* 241, 111-119.
- Ishii, Y. y Bender, M.A. (1980) Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 79, 19-32.
- Ivanov, E.L. y Haber, J.E. (1997) DNA repair: RAD alert. *Curr. Biol.* 7, 492-495.
- Jackson, S.P. y Jeggo, P.A. (1995) DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem. Sci.* 20, 412-415.
- Jeggo, P.A. (1985) Genetic analysis of X-ray-sensitive mutants of the CHO cell line. *Mutat. Res.* 146, 265-270.
- Jeggo, P.A. (1990) Studies on mammalian mutants defective in rejoining double-strand breaks in DNA. *Mutat. Res.* 239, 1-16.
- Jeggo, P.A. (1997) DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutat. Res.* 384, 1-14.
- Jeggo, P.A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 150, S80-S91.
- Jeggo, P.A. y Holliday, R. (1986) Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* 6, 2944-2949.
- Jeggo, P.A. y Kemp, L.M. (1983) X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line: Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents. *Mutat. Res.* 112, 313-327.
- Jeggo, P.A.; Tesmer, J. y Chen, D.J. (1991) Genetic analysis of ionizing radiation sensitive mutants of cultured mammalian cell lines. *Mutat. Res.* 254, 125-133.
- Jenkins, J.R.; Ayton, P.; Jones, T.; Davies, S.L.; Simmons, D.L.; Harris, A.L.; Sheer, D. y Hickson, I.D. (1992) Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res.* 20, 5587-5592.
- Jensen, L.H.; Nitiss, K.C.; Rose, A.; Dong, J.; Zhou, J.; Hu, T.; Osheroff, N.; Jensen, P.B.; Sehested, M. y Nitiss, J.L. (2000) A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bisdioxopiperazines. *J. Biol. Chem.* 275, 2137-3146.

- Jensen, P.B.; Jensen, P.S.; Demant, E.J.; Friche, E.; Sorensen, B.S.; Sehested, M.; Wassermann, K.; Vindelov, L.; Westergaard, O. y Hansen, H.H. (1991) Antagonistic effect of aclarubicin on daunorubicin-induced cytotoxicity in human small cell lung cancer cells: relationship to DNA integrity and topoisomerase II. *Cancer Res.* 51, 5093-5099.
- Jensen, P.B.; Sorensen, B.S.; Demant, E.J.; Sehested, M.; Jensen, P.S.; Vindelov, L. y Hansen, H.H. (1990) Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino) methanesulfonm-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Cancer Res.* 50, 3311-3316.
- Jensen, P.B.; Sorensen, B.S.; Sehested, M.; Grue, P.; Demant, E.J. y Hansen, H.H. (1994) Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments. *Cancer Res.* 54, 2959-2963.
- Jing, Y.; Ohizumi, H.; Kawazoe, N.; Hashimoto, S.; Masuda, Y.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. y Nakaya, K. (1994a) Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 645-651.
- Jing, Y.; Watabe, M.; Hashimoto, S.; Nakajo, S. y Nakaya, K. (1994b) Cell cycle arrest and protein kinase modulating effect of bufalin on human leukemia ML1 cells. *Anticancer Res.* 14, 1193-1198.
- Johnson, M.A.; Bryant, P.E. y Jones, N.J. (2000) Isolation of camptothecin-sensitive Chinese hamster cell mutants: phenotypic heterogeneity within the ataxia telangiectasia-like *XRCC8 (irs2)* complementation group. *Mutagenesis* 15, 367-374.
- Johnstone, A. y McNerney, R. (1985) Changes in topoisomerase I activity after irradiation of lymphoid cells. *Biosci. Rep.* 5, 907-912.
- Jones, N.J.; Cox, R. y Thacker, J. (1987) Isolation and cross-sensitivity of X-ray-sensitive mutants of V79-4 hamster cells. *Mutat. Res.* 254, 125-133.
- Jones, N.J.; Cox, R. y Thacker, J. (1988) Six complementation groups for ionizing-radiation sensitivity in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 193, 139-144.
- Jones, N.J.; Stewart, S.A. y Thompson, L.H. (1990) Biochemical and genetic analysis of the Chinese hamster mutants *irs1* and *irs2* and their comparison to cultured ataxia telangiectasia cells. *Mutagenesis* 5, 15-23.
- Juan, C.C.; Hwang, J.L.; Liu, A.A.; Whang-Peng, J.; Knutsen, T.; Huebner, K.; Croce, C.M.; Zhang, H.; Wang, J.C. y Liu, L.F. (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8910-8913.
- Kanaar, R. y Hoeijmakers J.H.J. (1997) Recombination and joining: different means to the same ends. *Genes Function* 1, 165-174.
- Kanaar, R.; Hoeijmakers J.H.J. y van Gent D.C. (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8, 483-489.
- Karran, P. (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics and Development* 10, 144-150.
- Kaufman, S.H. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukaemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49, 5870.

- Kawazoe, N.; Aiuchi, T.; Masuda, Y.; Nakajo, S. y Nakaya, K. (1999b) Induction of apoptosis by bufalin in human tumor cells is associated with a change of intracellular concentration of Na⁺ ions. *J. Biochem.* (Tokyo) 126, 278-286.
- Kawazoe, N.; Watabe, M.; Masuda, Y.; Nakajo, S. y Nakaya, K. (1999a) Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene* 18, 2413-2421.
- Kemp, L.M.; Sedgwick, S.G. y Jeggo, P.A. (1984) X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat. Res.* 132, 189-196.
- Keyse, S.M. (1993) The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Semin. Cancer Biol.* 4, 119-128.
- Kiefer, J. (1990) *Biological radiation effects*. Springer-Verlag, Berlin.
- Kim, J.H.; Kim, S.H.; Kolozsvary, A. y Khil, M.S. (1992) Potentiation of radiation response in human carcinoma cells in vitro and murine fibrosarcoma in vivo by topotecan, an inhibitor of DNA topoisomerase I. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 515-518.
- Kim, R.A. y Wang, J.C. (1989) Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 208, 257-267.
- Kim, R.A. y Wang, J.C. (1992) Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 267, 17178-17185.
- Kingma, P.S.; Greider, C.A. y Osheroff, N. (1997) Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase IIalpha and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 chromosomal breakpoints. *Biochemistry* 36, 5934-5939.
- Kogoma, T. (1996) Recombination by replication. *Cell* 85, 625-627.
- Kornberg, A. y Baker, T. (1992) *DNA synthesis*, 2nd ed. W.H. Freeman & Co., New York.
- Kowalczykowski, S.C. y Eggleston, A.K. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 991-1043.
- Kowalska-Loth, B.; Staron, K.; Buraczewska, I.; Szumiel, I.; Kapiszewska, M. y Lange, C.S. (1993) Reduced sensitivity to camptothecin of topoisomerase I from a L5178Y mouse lymphoma subline sensitive to X-radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1172, 117-123.
- Kretzschmar, M.; Meisterernst, M. y Roeder, R.G. (1993) Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11508-11512.
- Kroeger, P.E. y Rowe, T.C. (1989) Interaction of topoisomerase I with the transcribed region of the *Drosophila* HSP 70 heat shock gene. *Nucleic Acids Res.* 17, 8495-8509.
- Kunze, N.; Yang, G.C.; Dolberg, M.; Sundarp, R.; Knippers, R. y Richter, A. (1991) Structure of the human type I DNA topoisomerase gene. *J. Biol. Chem.* 266, 9610-9616.
- Kurosawa, M.; Numazawa, S.; Tani, Y. y Yoshida, T. (2000) ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C500-C508.
- Kusyk, C.J. y Hsu, T.C. (1979) Induction of high frequencies of endoreduplication in mammalian cell cultures with 33258 Hoechst and rubidazone. *Cytogenet. Cell Genet.* 23, 39-43.
- Kwan, K.Y. y Wang, J.C. (2001) Mice lacking DNA topoisomerase IIIbeta develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5717-5721.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.
- Laemmli, U.K.; Kas, E.; Poljak, L. y Adachi, Y. (1992) Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 275-285.
- Lanza, A.; Tornaletti, S.; Rodolfo, C.; Scanavini, M.C. y Pedrini, A.M. (1996) Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 271, 6978-6986.
- Larsen, A.K.; Gobert, C.; Gilbert, C.; Markovits, J.; Bojanowski, K.; y Skladanowski A. (1998) DNA topoisomerases as repair enzymes: mechanism(s) of action and regulation by p53. *Acta Biochim. Pol.* 45, 535-44.
- Lee, M.P.; Sander, M. y Hsieh, T.S. (1989) Single strand DNA cleavage reaction of duplex DNA by *Drosophila* topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 264, 13510-13518.
- Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186, 790-797.
- Lehrman, M.A.; Schneider, W.J.; Sudhof, T.C.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. y Russell, D.W. (1985) Mutations in the LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science* 227, 140-146.
- Lelievre, S.; Benchokroun, Y. y Larsen, A.K. (1995) Altered topoisomerase I and II activities in suramin-resistant lung fibrosarcoma cells. *Mol. Pharmacol.* 47, 898-906.
- Levin, N.A.; Bjornsti, M.A. y Fink, G.R. (1993) A novel mutation in DNA topoisomerase I of yeast causes DNA damage and RAD9-dependent cell cycle arrest. *Genetics* 133, 799-814.
- Li, J.Q. y Pardee, A.B. (1992) Enhanced lethality to human breast cancer cells of neocarzinostatin by camptothecin and beta-lapachone, a novel DNA topoisomerase I modulator with a different mode of action from camptothecin. *Proceedings of the Annual Meeting of American Association for Cancer Research* 33, A2585 (Abs).
- Li, Lei; Story, M. y Legerski, R.J. (2001) Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 49, 1157-1162.
- Li, W. y Wang, J.C. (1998) Mammalian DNA topoisomerase IIIalpha is essential in early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,1010-1013.
- Liang, F. y Jasin, M. (1996) Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J. Biol. Chem.* 271, 14405-14411.
- Liang, F.; Han, M.; Romanienko, P.J. y Jasin, M. (1998) Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5172-5177.
- Lieber, M.R.; Grawunder, U.; Wu, X. y Yaneva, M. (1997) Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 99-104.
- Lilley, D.M. (1983) Lilley DM. Eukaryotic genes are they under torsional stress? *Nature* 305, 276-277.
- Lima, C.D.; Wang, J.C. y Mondragon A. (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* 367, 138-146.
- Lin, F.L.; Sperle, K. y Sternberg, N. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell Biol.* 4, 1020-1034.
- Lindahl, T.; Prigent, C.; Barnes, D.E.; Lehmann, A.R.; Satoh, M.S.; Roberts, E.; Nash, R.A.; Tobins, P. y Daly, G. (1993) DNA joining in mammalian cells. *C.S.H. Symp. Quant. Biol.* 58, 619-624.

- Liu, L.F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 351-375.
- Liu, L.F. y Miller, K.G. (1981) Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3487-3491.
- Lopez, R.; Peters, G.J.; Smitskamp-Wilms, E.; Virizuela, J.A.; van Ark-Otte, J.; Pinedo, H.M. y Giaccone, G. (1994) In vitro sequence-dependent synergistic effect of suramin and camptothecin. *Eur. J. Cancer* 30, 1670-1674.
- Lüke-Huhle, C. (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during α -irradiation induced G2 arrest. *Mutat. Res.* 119, 407-413.
- Maftahi, M.; Han, C.S.; Langston, L.D.; Hope, J.C.; Zigouras, N. y Freyer, G.A. (1999) The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity. *Nucleic Acids Res.* 27, 4715-4724.
- Masuda, Y.; Kawazoe, N.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. y Nakaya, K. (1995) Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. *Leuk. Res.* 19, 549-556.
- Mattern, M.R. y Scudiero, D.A. (1981) Dependence of mammalian DNA synthesis on DNA supercoiling. III. Characteristics of the inhibition of replicative and repair-type DNA synthesis by novobiocin and nalidixic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 653, 248-258.
- Mattern, M.R.; Hofmann, G.A.; McCabe, F.L. y Johnson, R.K. (1991) Synergistic cell killing by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864). *Cancer Res.* 51, 5813-5816.
- Mattern, M.R.; Paone, R.F. y Day, R.S. (1982) Eukaryotic DNA repair is blocked at different steps by inhibitors of DNA topoisomerases and of DNA polymerases α and β . *Biochim. Biophys. Acta* 697, 6-13.
- Mayron, E. y Carroll, D. (1991,a) Involvement of single-stranded tails in homologous recombination of DNA injected into *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell Biol.* 11, 3268-3277.
- Mayron, E. y Carroll, D. (1991,b) Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: evidences for nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol. Cell Biol.* 11, 3278-3287.
- McCoubrey, W.K.Jr. y Champoux, J.J. (1986) The role of single-strand breaks in the catenation reaction catalyzed by the rat type I topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 261, 5130-5137.
- Menzel, R. y Gellert, M. (1994) The biochemistry and biology of DNA gyrase. *Adv. Pharmacol.* 29A, 39-69.
- Merino, A.; Madden, K.R.; Lane, W.S.; Champoux, J.J. y Reinberg, D. (1993) DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* 365, 227-232.
- Meyn, M. (1995) Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res.* 55, 5991-6001.
- Meyn, M.S. (1999) Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the *ATM* gene. *Clin. Genet.* 55, 289-304.
- Miles, C. y Meuth, M. (1989) DNA sequence determination of γ -radiation-induced mutations of the hamster *aprt* locus. *Mutat. Res.* 227, 97-102.
- Morris, S.K.; Baird, C.L. y Lindsley, J.E. (2000) Steady-state and rapid kinetic analysis of topoisomerase II trapped as the closed-clamp intermediate by ICRF-193. *J. Biol. Chem.* 275, 2613-2628.
- Mosig, G. (1987) The essential role of recombination in phage T4 growth. *Ann. Rev. Genet.* 21, 347-371.

- Muller, M.T.; Pfund, W.P.; Mehta, V.B. y Trask, D.K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *EMBO J.* 4, 1237-1243.
- Nakajima, T.; Ohi, N.; Arai, T.; Nozaki, N.; Kikuchi, A. y Oda, K. (1995) Adenovirus E1A-induced apoptosis elicits a steep decrease in the topoisomerase II alpha level during the latent phase. *Oncogene* 10, 651-662.
- Natarajan, A.T. y Obe, G. (1984) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: III. Restriction endonucleases. *Chromosoma* 90, 120-127.
- Negrini, M.; Felix, C.A.; Martín, C.; Lange, B.J.; Nakamura, T.; Canaani, E. y Croce, C.M. (1993) Potential topoisomerase II DNA-binding sites at the breakpoints of a t(9;11) chromosome translocation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 53, 4489-4492.
- Ng, S.W.; Liu, Y.; Hasselblatt, K.T.; Mok, S.C. y Berkowitz, R.S. (1999) A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. *Nucleic Acids Res.* 27, 993-1000.
- Nitiss, J.L. (1994) Roles of DNA topoisomerases in chromosomal replication and segregation. *Adv. Pharmacol.* 29A, 103-134.
- Nitiss, J.L. (1998) Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 63-81.
- Obe, G.; Johannes, C.; Schulte-Frohlinde, D. (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12.
- Ogata, N.; Ueda, K.; Kawaichi, M. y Hayaishi, O. (1981) Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei. *J. Biol. Chem.* 256, 4135-4137.
- Onishi, Y.; Azuma, Y.; Sato, Y.; Mizuno, Y.; Tadakuma, T. y Kizaki, H. (1993) Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1175, 147-154.
- Osheroff, N. (1986) Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. *J. Biol. Chem.* 261, 9944-9950.
- Osheroff, N. (1987) Role of the divalent cation in topoisomerase II mediated reactions. *Biochemistry* 26, 6402-6406.
- Osheroff, N. (1989a) Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol. Ther.* 41, 223-241.
- Osheroff, N. (1989b) Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide. *Biochemistry* 28, 6157-6160.
- Osheroff, N. y Zechiedrich, E.L. (1987) Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form. *Biochemistry* 26, 4303-4309.
- Osheroff, N.; Shelton, E.R. y Brutlag, D.L. (1983) DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.* 258, 9536-9543.
- Östling, O. y Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- Painter, R.B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70, 337-341.
- Pâques, F. y Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349-404.

- Pastor, N. y Cortés, F. (2002) DNA topoisomerase activities in Chinese hamster radiosensitive mutants after x-ray treatment. *Cell Biol. Int.* 26, 547-555.
- Pastor, N.; Domínguez, I.; Mateos, S. y Cortes, F. (2002a) A comparative study of genotoxic effects of anti-topoisomerase II drugs ICRF-193 and bufalin in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 515, 171-180.
- Pastor, N.; Flores, M.J.; Domínguez, I.; Mateos, S. y Cortés F. (2002b) High yield of endoreduplication induced by ICRF-193: a topoisomerase II catalytic inhibitor. *Mutat. Res.* 516, 113-120.
- Pastor, N.; Piñero, J.; Ortiz, T.; Mateos, J.C.; De Miguel, M. y Cortés, F. (1999) Topoisomerase activities and levels in irradiated Chinese hamster AA8 cells and in its radiosensitive mutant EM9. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1035-1042.
- Patel, S.; Jazrawi, E.; Creighton, A.M.; Austin, C.A. y Fisher, L.M. (2000) Probing the interaction of the cytotoxic bisdioxopiperazine ICRF-193 with the closed enzyme clamp of human topoisomerase II α . *Mol. Pharmacol* 58, 560-568.
- Permana, P.A.; Snapka, R.M.; Shen, L.L.; Chu, D.T.; Clement, J.J. y Plattner, J.J. (1994). Quinobenoxazines: a class of novel antitumor quinolones and potent mammalian DNA topoisomerase II catalytic inhibitors. *Biochemistry* 33, 11333-11339.
- Peter, B.J.; Ullsperger, C.; Hiasa, H.; Marians, K.J. y Cozzarelli, N.R. (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819-827.
- Petes, T.D.; Malone, R.E. y Symington, L.S. (1991) En: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Broach, J.R.; Pringle, J.R. y Jones, E.W.; eds), pp. 407-521, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Petrini, J.H.; Bressan, D.A. y Yao, M.S. (1997) *Semin. Immunol.* 9, 181-188.
- Pfeiffer, P.; Goedecke, W. y Obe, G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.
- Pommier, Y. (1993) DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 103-108.
- Pommier, Y. DNA Topoisomerase II Inhibitors. In : *Cancer Therapeutics, Experimental and Clinical Agents*. Beverly A. Teicher. Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, 1997.
- Pommier, Y. y Bertrand, R. (1993) The mechanisms of formation of chromosomal aberrations: role of eukaryotic DNA topoisomerases. In: *Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations*. Kirsch IR (ed). CRC Press, Boca Raton, pp277-309.
- Pommier, Y.; Zwelling, L.A.; Kao-Shan, C.S.; Whang-Peng, J. y Bradley, M.O. (1985) Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 45, 3143-3149.
- Popanda, O. y Thielmann, H.W. (1992) The function of DNA topoisomerases in UV-induced DNA excision repair: studies with specific inhibitors in permeabilized human fibroblasts. *Carcinogenesis* 13, 2321-2328.
- Poulson, R., Krasny, J. y Zbarsky, S.H. (1974) Characterisation of nuclear and cytoplasmic DNA polymerases from rat intestinal mucosa. *Can. J. Biochem.* 52, 162-169.
- Povirk, L.F. y Austin, M.J.F. (1991) Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.* 257, 127-143.

- Redinbo, M.R.; Stewart, L.; Champoux, J.J. y Hol, W.G.J. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 6, 1504-1513.
- Reitman, M. y Felsenfeld, G. (1990) Developmental regulation of topoisomerase II sites and DNase I-hypersensitive sites in the chicken beta-globin locus. *Mol. Cell Biol.* 10, 2774-2786.
- Resnick, M.A. (1976) The repair of double strand breaks in DNA: a model involving recombination. *J. Theor. Biol.* 59, 97-106.
- Rizzoni, M. y Palitti, F. (1973) Regulatory mechanism of cell division. I. Colchicine-induced endoreduplication. *Exp. Cell Res.* 77, 450-458.
- Robinson, M.J. y Osheroff, N. (1990) Stabilization of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs: inhibition of enzyme-mediated DNA religation by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide. *Biochemistry* 29, 2511-2515.
- Robinson, M.J. y Osheroff, N. (1991) Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry* 30, 1807-1803.
- Robson, C.N.; Harris, A.L. y Hickson, I.D. (1989) Defective repair of DNA single- and double-strand breaks in the bleomycin- and X-ray-sensitive Chinese hamster ovary cell mutant BLM-2. *Mutat. Res.* 217, 93-100.
- Robson, C.N.; Hoban, P.R.; Harris, A.L. y Hickson, I.D. (1987) Cross-sensitivity to topoisomerase II inhibitors in cytotoxic drug-hypersensitive Chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res.* 47, 1560-1565.
- Roca, J.; Ishida, R.; Berger, J.M.; Andoh, T. y Wang, J.C. (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1781-1785.
- Rose, D. y Holm, C. (1993) Meiosis-specific arrest revealed in DNA topoisomerase II mutants. *Mol. Cell Biol.* 13, 3445-3455.
- Rose, D.; Thomas, W. y Holm, C. (1990) Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell* 60, 1009-1017.
- Roth, D.B. y Wilson J.H. (1988) Illegitimate recombination in mammalian cells. En: Kucherlapati R. y Smith G. (eds). Genetic recombination, A.S.M. Press, Washington, D.C., pp. 621-653.
- Russell, P. y Nurse, P. (1987) The mitotic inducer nim1+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell* 49, 569-576.
- Samuels, D.S. y Shimizu, N. (1992) DNA topoisomerase I phosphorylation in murine fibroblasts treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and in vitro by protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 11156-11162.
- Sandri, M.I.; Isaacs, R.J.; Ongkeko, W.M.; Harris, A.L.; Hickson, I.D.; Broggin, M. y Vikhanskaya, F. (1996) p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res.* 24, 4464-4470.
- Savitsky, K.; Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L.; Tagle, D.A.; Smith, S.; Uziel, T.; Sfez, S.; Ahkenazi, M.; Pecker, I.; Frydman, M.; Harnik, R.; Patanjali, S.R.; Simmons, A.; Clines, G.A.; Sartiell, A.; Gatti, R.A.; Chessa, L.; Sanal, O.; Lavin, M.F.; Jaspers, N.G.J.; Malcolm, A.; Taylor, R.; Arlett, C.F.; Miki, T.; Weissman, S.M.; Lovett, M.; Collins, F.S. y Shiloh, Y. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI 3-kinase. *Science* 268, 1749-1753.
- Schon, E.; Evans, T.; Welsh, J. y Efstratiadis, A. (1983) Conformation of promoter DNA: fine mapping of S1-hypersensitive sites. *Cell* 35, 837-848.

- Schwartz, J.L.; Rotmensch, J.; Beckett, M.A.; Jaffe, D.R.; Toohill, M.; Giovanazzi, S.M.; McIntosh, I. y Weichselbaum, R.R. (1988) X-ray and *cis*-diammine dichloro-platinum (II) cross-resistance in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, 5133-5135.
- Seki, T.; Seki, M.; Onodera, R.; Katada, T. y Enomoto, T. (1998) Cloning of cDNA encoding a novel mouse DNA topoisomerase III (Topo II β) possessing negatively supercoiled DNA relaxing activity, whose message is highly expressed in the testis. *J. Biol. Chem.* 273, 28553-28556.
- Selleck, S.B.; Elgin, S.C. y Cartwright, I.L. (1984) Supercoil-dependent features of DNA structure at *Drosophila* locus 67B1. *J. Mol. Biol.* 178, 17-33.
- Shamu, C.E. y Murray, A.W. (1992) Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J. Cell Biol.* 117, 921-934.
- Shero, J.H.; Bordwell, B.; Rothfield, N.F. y Earnshaw, W.C. (1986) High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 231, 737-740.
- Shiloh, Y. (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu. Rev. Genet.* 31, 635-662.
- Shimamoto, A.; Nishikawa, K.; Kitao, S. y Furuichi, Y. (2000) Human RecQ5 β , a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3 α and 3 β . *Nucleic Acids Res.* 28, 1647-1655.
- Siddiqi, M.A. y Bothe, E. (1987) Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat. Res.* 112, 449-464.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S. y Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112.
- Slichenmyer, W.J.; Rowinsky, E.K.; Donehower, R.C. y Kaufmann, S.H. (1993) The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 271-291.
- Smith, P.J.; Makinson, T.A. y Watson, J.V. (1989) Enhanced sensitivity to camptothecin in ataxia-telangiectasia cells and its relationship with the expression of DNA topoisomerase I. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 217-231.
- Sørensen, B.S.; Sinding, J.; Andersen, A.H.; Alsner, J.; Jensen, P.B. y Westergaard, O. (1992) Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J. Mol. Biol.* 228, 778-786.
- Staron, K.; Kowalska-Loth, B.; Zabek, J.; Czerwinski, R.M.; Nieznanski, K. y Szumiel, I. (1995) Topoisomerase I is differently phosphorylated in two sublines of L5178Y mouse lymphoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1260, 35-42.
- Subramanian, D.; Rosenstein, B.S. y Muller, M.T. (1998) Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res.* 58, 976-984.
- Sumner, A.T. (1995) Inhibitors of topoisomerase II delay progress through mitosis and induce a doubling of the DNA content in CHO cells. *Exp. Cell Res.* 217, 440-447.

- Sumner, A.T. (1998) Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II. *Chromosoma* 107, 486-490.
- Sutou, S. (1981) Spontaneous sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vivo and in vitro. *Mutat. Res.* 82, 331-341.
- Sutou, S. y Tokuyama, F. (1974) Induction of endoreduplication in cultured mammalian cells by some chemical mutagens. *Cancer Res.* 34, 2615-2623.
- Szostak, J.W.; Orr-Weaver, T.-L.; Rothstein, R. y Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Takasuga, Y.; Andoh, T.; Yamashita, J. y Yagura, T. (1995) ICRF-193, an inhibitor of topoisomerase II, demonstrates that DNA replication in sperm nuclei reconstituted in *Xenopus* egg extracts does not require chromatin decondensation. *Exp. Cell Res.* 217, 378-384.
- Tanabe, K.; Ikegami, Y.; Ishida, R. y Andoh, T. (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res.* 51, 4903-4908.
- Thacker, J. (1999) Repair of ionizing radiation damage in mammalian cells. Alternative pathways and their fidelity. *C. R. Acad. Sci.* 322, 103-108.
- Thacker, J. y Ganesh, A.N. (1990) DNA break repair, radioresistance of DNA synthesis and camptothecin sensitivity in the radiation-sensitive *irs* mutants: comparisons to ataxia-telangiectasia cells. *Mutat. Res.* 235, 49-58.
- Thacker, J. y Wilkinson, R.E. (1991) The genetic basis of resistance to ionizing radiation damage in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 254, 135-142.
- Thielmann, H.W. y Popanda, O. (1998a) Irradiation with ultraviolet light and γ -rays increases the level of DNA topoisomerase II α in nuclei of normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Int. J. Oncol.* 12, 265-271.
- Thielmann, H.W. y Popanda, O. (1998b) Doxorubicin and γ rays increase the level of DNA topoisomerase II α in nuclei of normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 355-366.
- Thielmann, H.W.; Popanda, O.; Gersbach, H. y Gilberg, F. (1993) Various inhibitors of DNA topoisomerases diminish repair-specific DNA incision in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 14, 2341-2351.
- Thompson, L.H. (1996) Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways. *Mutat. Res.* 363, 77-88.
- Thompson, L.H. y Schild, D. (2001) Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.* 477, 131-153.
- Thompson, L.H.; Brookman, K.W.; Dilleay, L.E.; Carrano, A.V.; Mazrimas, J.A.; Mooney, C.L. y Minkler, J.L. (1982) A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in strand-break repair, and an extraordinarily baseline frequency of sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 95, 427-440.
- Thompson, L.H.; Brookman, K.W.; Jones, N.J.; Allen, S.A. y Carrano, A.V. (1990) Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.* 10, 6160-6171.
- Thompson, L.H.; Rubin, J.S.; Cleaver, J.E.; Whitmore, G.F. y Brookman, K. (1980) A screening method for isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells. *Somatic Cell Genet.* 6, 391-405.

- Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Tsai-Pflugfelder, M.; Liu, L.F.; Liu, A.A.; Tewey, K.M.; Whang-Peng, J.; Knutsen, T.; Huebner, K.; Croce, C.M. y Wang, J.C. (1988) 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* 85, 7177-71781.
- Tsukamoto, Y. e Ikeda, H. (1998) Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. *Genes Cells* 3, 135-144.
- Tsukamoto, Y.; Kato, J. e Ikeda, H. (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388, 900-903.
- Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Okada, S.; Watanabe, M.; Shohmori, T.; Seki, S. y Inoue, Y. (1993) Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *J. Biol. Chem.* 268, 19076-19083.
- Uemura, T. y Yanagida, M. (1984) Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J.* 3, 1737-1744.
- Uemura, T.; Ohkura, H.; Adachi, Y.; Morino, K.; Shiozaki, K. y Yanagida, M. (1987) DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50, 917-925.
- Ura, K. y Hirose, S. (1991) Possible role of DNA topoisomerase II on transcription of the homeobox gene *Hox-2.1* in F9 embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 6087-6092.
- Utsumi, H.; Shibuya, M.L.; Kosaka, T.; Buddenbaum, W.E. y Elkind, M.M. (1990) Abrogation by novobiocin of cytotoxicity due to the topoisomerase II inhibitor amsacrine in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 50, 2577-2581.
- Vnencak-Jones, C.L.; Phillips, J.; Chen, E.Y. y Seeburg, P.H. (1988) Molecular basis of human growth hormone gene deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5615-5619.
- von Sonntag, C. (1987) *The chemical basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London.
- Wang, J.C. (1985) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 665-669.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *A. Rev. Biochem.* 65, 635-692.
- Wang, J.C.; Caron, P.R. y Kim, R.A. (1990) The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell* 62, 403-406.
- Wang, Q.; Zambetti, G.P. y Suttle, D.P. (1997) Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol. Cell Biol.* 17, 389-397.
- Wang, J.C. (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J. Biol. Chem.* 266, 6659-6662.
- Ward, J.F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35, 95-125.
- Wassermann, K. (1994) Intragenomic heterogeneity of DNA damage formation and repair: a review of cellular responses to covalent drug DNA interaction. *Crit. Rev. Tox.* 24, 281-322.
- Watabe, M.; Masuda, Y.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. y Nakaya, K. (1996) The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 14067-14072.

- Watabe, M.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. y Nakaya, K. (1997) Treatment of U937 cells with bufalin induces the translocation of casein kinase 2 and modulates the activity of topoisomerase II prior to the induction of apoptosis. *Cell Growth Differ.* 8, 871-879.
- Watson, J.D. y Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* (London) 171, 737.
- Webster, R.P. y Bhattacharya, R.K. (1995) Activity of some nuclear enzymes associated with DNA repair following hepatocarcinogen administration to rats. *J. Biochem. Toxicol.* 10, 33-40.
- Weeda, G. y Hoeijmakers J.H.J. (1993) Genetic analysis of nucleotide excision repair in mammalian cells. *Semin. Cancer Biol.* 4, 105-117.
- Weisbrod S. (1982) Active chromatin. *Nature* 297, 289-289.
- Wood, E.R. y Earnshaw, W.C. (1990) Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. *J. Cell Biol.* 111, 2839-2850.
- Wu, L.; Davies, S.L.; North, P.S.; Goulaouic, H.; Riou, J.F.; Turley, H.; Gatter, K.C. y Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J. Biol. Chem* 275, 9636-9644.
- Yaneva, M.; Kowalewski, T. y Lieber, M.R. (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 16, 5098-5112.
- Yang, L.; Wold, M.S.; Li, J.J.; Kelly, T.J. y Liu, L.F. (1987) Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication in vitro.
- Yoshida, A.; Ueda, T.; Wano, Y. y Nakamura, T. (1993) DNA damage and cell killing by camptothecin and its derivative in human leukemia HL-60 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 566-573.
- Yuwen, H.; Hsia, C.C.; Nakashima, Y.; Evangelista, A. y Tabor, E. (1997) Binding of wild-type p53 by topoisomerase II and overexpression of topoisomerase II in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 194-197.
- Zanier, R.; De Salvia, R.; Fiore, M. y Degrossi, F. (1996) Topoisomerase I activity and cellular response to radiation in Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 251-259.
- Zdzienicka, M.Z. (1995) Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 336, 203-213.
- Zdzienicka, M.Z. (1999) Mammalian X-ray-sensitive mutants which are defective in non-homologous (illegitimate) DNA double-strand break repair. *Biochimie* 81, 107-116.
- Zdzienicka, M.Z. y Simons, J.W.I.M. (1987) Mutagen-sensitive cell lines are obtained with a high frequency in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 178, 235-244.
- Zdzienicka, M.Z.; Jaspers, N.G.J.; van der Schans, G.P.; Natarajan, A.T. y Simons, J.W.I.M. (1989) Ataxia-telangiectasia-like Chinese hamster V79 cell mutants with radioresistant DNA synthesis, chromosomal instability, and normal DNA strand break repair. *Cancer Res.* 49, 1481-1485.
- Zechiedrich, E.L. y Osheroff, N. (1990) Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.* 9, 4555-4562.
- Zechiedrich, E.L.; Christiansen, K.; Andersen, A.H.; Westergaard, O. y Osheroff, N. (1989) Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry* 28, 6229-6236.

-Zhang, L.; Nakaya, K.; Yoshida, T. y Kuroiwa, Y. (1992) Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. *Cancer Res.* 52, 4634-4641.

-Zhou, B.B. y Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.

-Zhu, J. y Schiestl, R.H. (1996) Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 1805-1812.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Recibido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de 12 de Julio, para juzgar la Tesis Doctoral de
NURIA MARÍA PASTOR CARRILLO
TOPONIMIAS Y REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL
AOR INVEIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE

aportó otorgando la calificación de SOBRESALIENTE CON LAUDE

Sevilla, 12 de Diciembre de 2002

El Vocal,


GABRIEL P. O.
El PRESIDENTE

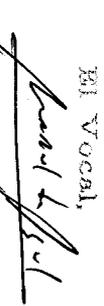
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,


Gabriel P. O.
El Doctorado

El Doctorado


Nuria M. P.

