

RESUM

L'ester de forbol TPA, l'ionòfor A23187, i el 2,4-dinitrofenol incrementen la resistència al MTX en línies cel·lulars de CHO. Donat que aquests tres efectors tenen en comú un mecanisme d'actuació *via* calci, suggerim que aquest catió està implicat, molt probablement a través de canvis en l'activitat de la PKC, en el desenvolupament de la resistència al MTX per ampliació de la *dhfr*.

INTRODUCCIO

La resistència a la quimioteràpia cancerosa és un problema seriós per a l'efectivitat clínica d'aquest tractament. La resistència pot ésser provocada per una reducció en l'acumulació de la droga administrada com a conseqüència d'un efluxe actiu incrementat (1); per l'aparició de clons mutants que transporten menys eficientment la droga cap a l'interior cel·lular (2) o que contenen una forma alterada, més resistent, de la molècula objecte d'inhibició (3); i finalment, per ampliació gènica en què el número de còpies per un gen determinat pot estar incrementat de gran manera (fins 1000 còpies)(4). Aquest és el cas en la gran majoria de les cèl·lules que esdevenen resistents per tractament amb metotrexat (MTX), un inhibidor de l'enzim dihidrofolat reductasa (5). El mecanisme de l'ampliació gènica i la transducció dels senyals que condueixen a la mateixa estan actualment sota investigació. Recentment, hem començat a estudiar les vies bioquímiques que poden desenvolupar aquest tipus de resistència. Com a punt de partida vam prendre els resultats originals del grup de Varshavsky (6,7) que observaren que els esters de forbol i hormones mitogèniques (insulina, vasopresina i EGF) són capaços d'incrementar la incidència de resistència davant el MTX en cèl·lules 3T6 mitjançant un mecanisme d'ampliació. Fins l'actualitat, hem demostrat que en cèl·lules d'ovari d'hamster (CHO), s'incrementa la resistència al MTX pels esters de forbol i per agents que mobilitzen el calci com ara l'ionòfor A23187 i inhibidors metabòlics com el 2,4-dinitrofenol (DNP) la qual cosa demostra un paper d'aquest catió en el procés d'ampliació gènica.

MATERIALS I METODES

Les línies cel·lulars utilitzades (UA21 i K1 de CHO, i rat-1) es van créixer regularment en medi de cultiu MEM amb penicil·lina i estreptomicina suplementat amb un 7% de serum fetal. En els experiments destinats a quantificar la resistència al MTX, el medi selectiu era F12 (HAM) amb doble contingut d'aminoàcids i vitamines i sense glicina, hipoxantina i timidina. El contingut de serum d'aquest medi era del 5% després de diàlisi en front de PBS (6 canvis) per un espai de temps de tres dies, per eliminar compostos de baix pes molecular (com ara purines). A més aquest medi era addicionat de concentracions variables de metotrexat, dissolt en el propi medi -GHT. Els efectors (TPA, A23187 i DNP) eren dissolts en DMSO i afegits al medi a la concentració desitjada sense superar el 1% de DMSO. El medi es canviava cada 7 dies, mantenint el MTX i sense els efectors per un total de tres setmanes. En aquest punt es realitzava el comptatge de les colònies després de la seva tinció amb Violeta de genciana.

El TPA i l'A23187 es van obtenir de Sigma, el DNP de Merck i el MTX dels Laboratoris Almirall.

RESULTATS

Es coneguda la capacitat d'amplificació de línies cel·lulars sotmeses a selecció gradual amb concentracions creixents de MTX. Per aquesta raó, vam realitzar uns experiments previs amb la fi de determinar les concentracions mínimes de MTX capaces de produir la mort cel·lular de diferents línies de CHO i de conduir a una també mínima producció de colònies resistents. Aquestes concentracions van variar depenent del número de còpies de *dhfr* de les cèl·lules; així per a la línia UA21 (1 còpia) la concentració de MTX que complia els requeriments esmentats va ésser de 2×10^{-8} M i per a la línia K1 (2 còpies) 3×10^{-7} M. A continuació vam intentar reproduir l'efecte del TPA, trobat en cèl·lules 3T6, en línies cel·lulars de CHO. L'interès en utilitzar aquestes línies és la disponibilitat de nombrosos mutants en el locus *dhfr* amb característiques ja conegudes (8,9). Com es pot observar a la Figura 1, el 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetat (TPA) a la concentració de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ causà un increment en el número de colònies resistents al MTX. L'efecte més clar es va obtenir amb la línia K1 i per aquesta raó vam continuar l'experimentació amb aquesta. La resistència assolida sembla ser relativament estable car el número de colònies resistents és el mateix tant si la selecció en MTX després de la primera setmana es fa en presència com en absència de TPA. Per comprovar la generalitat d'aquest efecte vam assajar l'acció del TPA en cèl·lules rat-1 en les que també es va observar l'increment en el número de colònies resistents. L'efecte del TPA sobre cèl·lules K1 és dependent de la concentració com hom pot observar a la Fig. 2, que a la vegada és incrementat si les cèl·lules són pretractades amb TPA (0.1 $\mu\text{g/ml}$) abans de realitzar la selecció amb MTX en presència de una segona dosi de TPA.

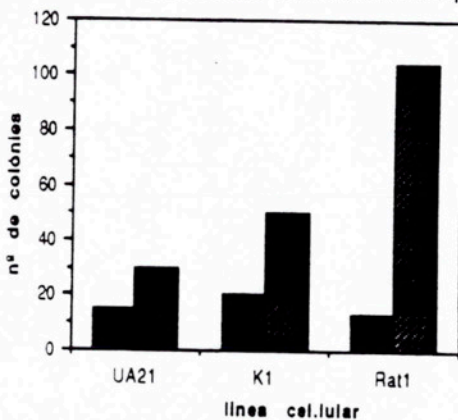


FIG.1: Resistència a MTX en diferents línies cel·lulars en absència (barres sòlides) o en presència de 0.1 μg de TPA/ml. (barres ratllades).

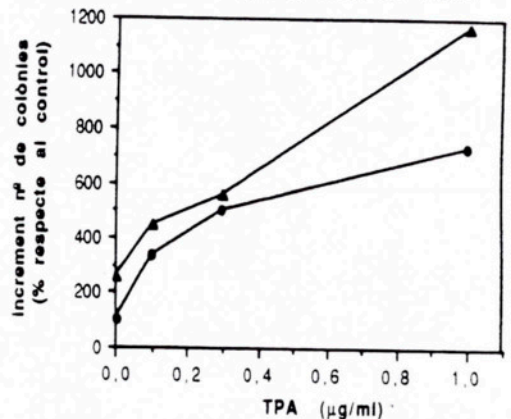


FIG.2: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX (3×10^{-7} M) en presència de concentracions creixents de TPA. (●) TPA i MTX afegits alhora. (▲) cèl·lules pretractades amb TPA durant 48 h

A continuació, per assajar una implicació directa del calci sobre la resistència al MTX, vam incubar les cèl·lules amb concentracions creixents de l'ionòfor de calci A23187 i una fixa de MTX. Com hom pot observar a la Figura 3, aquest ionòfor va causar un increment dependent de la concentració en el número de colònies resistents al MTX. L'efecte màxim es produí a 1 nM d'A23187.

Finalment, vam incubar les cèl·lules CHO K1 amb diferents concentracions de DNP, que causa la mobilització del calci com a conseqüència del decrement en la concentració d'ATP cel·lular (10). L'acció d'aquest inhibidor metabòlic va produir també un increment en el número de colònies resistents al MTX d'una manera dependent de la concentració, amb un efecte màxim a 10 μM (Figura 4).

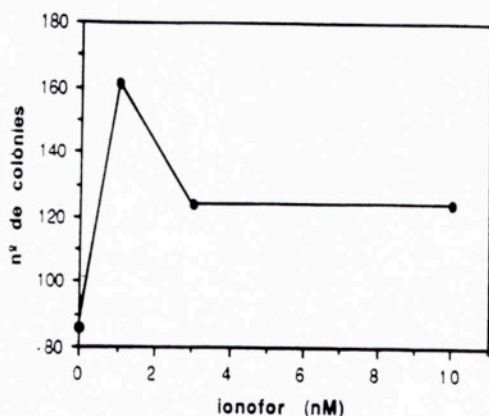


FIG. 3: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) en presència de concentracions creixents d'ionòfor A23187

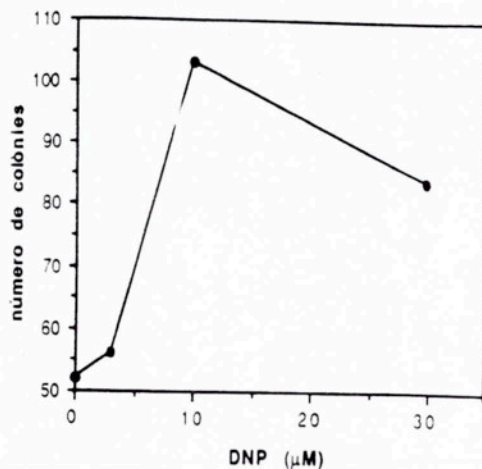


FIG.4: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) en presència de concentracions creixents de 2,4-Dinitrofenol

Les colònies primàries resistents formades per la presència del DNP van ser clonades i resembrades en medi que contenia la mateixa concentració de MTX emprada en la selecció original ($3 \times 10^{-7} \text{M}$). Aquestes cèl·lules aïllades van ser capaces en el 100% dels casos de tornar a formar colònies cosa que descartava la formació de pseudocolònies en el primer pas de selecció.

DISCUSSIO

L'observació principal que descrivim és la capacitat de l'ester de forbol TPA, l'ionòfor A23187 i el DNP d'incrementar, d'una manera dependent de la concentració, el número de colònies resistents al MTX en cèl·lules CHO. Tot i que l'efecte del TPA s'havia descrit en cèl·lules 3T6, sorprenentment, no s'havia fet cap referència al possible involucrament de la PKC en aquest procés ni s'havia assajat l'efecte d'ionòfors de calci.

Un comú denominador d'aquests tres agents és el d'activar la PKC via calci: El TPA per un increment del DAG que disminueix la K_m de la PKC pel calci; l'ionòfor per un augment de la concentració de calci intracel·lular i el DNP per una mobilització del calci des del reticle endoplàsmic.

Els experiments realitzats fins ara s'han fet amb cèl·lules en presència de TPA durant un mínim d'una setmana. Tanmateix, és conegut que la incubació cel·lular amb TPA per un espai de temps entre 24 i 48h transloca, proteolítza i finalment esgota la PKC. Això planteja la possibilitat que l'increment en la resistència sigui conseqüència de l'activació a curt termini de la PKC o de l'absència d'aquesta activitat quan és esgotada d'ambdues localitzacions cel·lulars: citosol i membranes. Per

tal de discernir entre les dues possibilitats, estem realitzant incubacions de curta durada (de l'ordre d'hores) amb TPA en què hi ha translocació i activació de la PKC però encara no està esgotada del citoplasma, i amb inhibidors de la PKC. Tant si és degut a una activació com a una inactivació de la PKC, sembla clar que el calci seria el senyal que desencadenaria el procés de resistència. El calci també està implicat en la resistència a altres drogues com els alcalòids de la vinca i aquesta resistència és revertida per inhibidors de canals de calci com el verapamil (11). En aquests casos, la resistència és deguda a la glicoproteïna-P, que actua com una bomba expulsora de droga i així aquesta s'acumula menys. En el cas del MTX, però, la resistència és principalment deguda a l'amplificació del gen *dhfr* tal com succeeix amb el TPA en cèl.lules 3T6. Estem en el procés de mesurar el número de còpies en les nostres línies resistents. Tanmateix, hi ha probes que indiquen que la resistència que observem és deguda a amplificació: 1) Que les colònies de cèl.lules resistents creixen i s'acaben de formar a les tres setmanes de selecció en presència de MTX encara que els efectors estiguin presents amb les cèl.lules només durant la primera setmana; 2) Que el TPA té un efecte acumulatiu sobre la resistència si les cèl.lules són pretractades amb l'ester de forbol; 3) Que totes les colònies primàries obtingudes mantenen la seva resistència al MTX després de clonació. Tot això suggereix uns canvis genòmics estables molt probablement degut a un increment en el número de còpies en comptes d'un increment transitori de l'extrusió de la droga emprada. En sumari, proposem que, almenys en part, la resistència al MTX en cèl.lules CHO causada pel TPA, ionòfor A23187 i DNP està mediatitzada per canvis en l'activitat PKC mitjançant un mecanisme dependent de calci.

REFERENCIES

- 1.- Rogan, A.M., Hamilton, T.C., Young, R.C., Klecker, R.W. & Ozols, R.F. (1984) *Science* 224,994-996
- 2.- Flintoff, W.F., Davidson, S.V., & Siminovitch, L. (1976) *Somatic Cell Genet.* 2, 245-262
- 3.- Albrecht, A.M., Biedler, J.L. & Hitchinson, D.J. (1972) *Cancer Res.* 32, 1539-1546
- 4.- Looney, J.E. & Hamlin, J. L. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 569-577
- 5.- Alt, F.W., Kellens, R.E.; Bertino, J.R. & Schimke, R.T. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1357-1370
- 6.- Varshavsky, A. (1981) *Cell* 25, 561-572
- 7.- Barsoum, J. & Varshavsky, A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5330-5334
- 8.- Ciudad, C.J., Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16274-16282
- 9.- Ciudad, C.J., Morris, A.E., Jeng, C. & Chasin, L.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 3650-3656
- 10.- Blackmore, P.F., Hugues, B.P., Shuman, E.A. & Exton, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 190-197
- 11.- Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. (1983) *Cancer Res.* 43, 2905-2910

AGRAIMENTS

V. Noé gaudeix d'un ajut a projectes d'iniciació a la recerca per part de la C.I.R.I.T. i és becaria del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.