

ELS INHIBIDORS DE LA PROTEINA QUINASA C DISMINUEIXEN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA AMB METOTREXAT

Verònica Noé i Carlos J. Ciudad

Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular.

Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició. Universitat de Barcelona. 08028 Pedralbes

RESUM

La resistència a la quimioteràpia que utilitza metotrexat (MTX) ve produïda per un mecanisme depenent de calci car s'incrementa per efecte dels ionòfors d'aquest catió, A23187 i ionomicina, pel 2,4-dinitrofenol així com per l'èster de forbol TPA. Concluïm que la proteïna quinasa C, l'activitat de la qual és depenent de calci, forma part de la via que condueix al desenvolupament de la resistència al metotrexat per amplificació de la DHFR ja que aquest procés pot ésser reduït mitjançant l'H-7, l'àcid glicirretínic, l'estaurosporina i la calfofina, inhibidors de la proteïna quinasa C. Els inhibidors de la PKC també són capaços de disminuir la resistència al MTX estimulada per hidroxiurea i afidocolina, agents que inhibeixen la síntesi de DNA. Aquesta disminució també s'aconsegueix per acció de sulfur de dialil, un inhibidor de la lipoperoxidació. D'aquesta investigació es despren la possibilitat de fer servir inhibidors de la PKC o de la lipoperoxidació com a coadjuvants en el tractament amb MTX que actuïn com a moduladors de la resistència a la quimioteràpia.

INTRODUCCIO

A la quimioteràpia del càncer que utilitza metotrexat (MTX), inhibidor de la dihidrofolat reductasa, es produeix un greu problema de resistència degut a l'amplificació del gen que codifica per a aquest enzim. Un dels nostres propòsits és investigar les vies bioquímiques que condueixen a aquesta amplificació. Una finalitat pràctica que es podria derivar d'aquesta investigació seria reduir l'amplificació mitjançant l'administració de un possible modulador de la resistència juntament amb el metotrexat.

RESULTATS

Vam assajar diferents efectors capaços d'incrementar el número de colònies resistents al MTX.

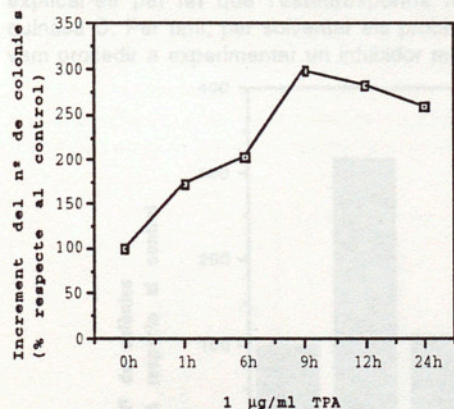


FIGURA 1. Efecte del TPA sobre la resistència a $3 \times 10^{-7}M$ de Metotrexat

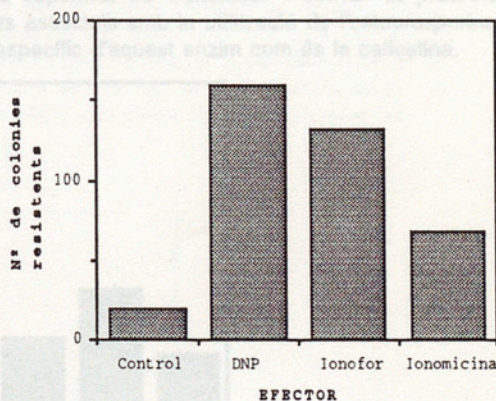


FIGURA 2. Efecte de $10 \mu M$ DNP, $1 nM$ Ionofor i $1 nM$ ionomicina durant 9 hores sobre la resistència al MTX

En aquest sentit, i en primer lloc, vam reproduir l'efecte de l'èster de forbol TPA (Varshavsky, 1981) en cèl.lules CHO K1 (Fig. 1). Ja que el TPA és un activador de la proteïna quinasa C, un enzim depenent de calci, vam experimentar l'efecte de la mobilització intracel.lular de calci

mitjançant els ionòfors de calci A23187 i ionomicina, així com el dinitrofenol. En els tres casos vam obtenir un major número de colònies resistents a 3×10^{-7} M MTX respecte als corresponents controls, no tractats amb l'efector (Fig. 2). Ans al contrari, quan s'incubaven les cèl.lules amb EGTA, s'observava una disminució del número de les colònies resistents al MTX després d'ésser tractades les cèl.lules amb TPA.

Per corroborar la implicació de l'activació de la proteïna quinasa C en la resistència al tractament amb MTX, vam realitzar una sèrie d'experiments amb inhibidors d'aquest enzim com són l'estaurosporina, l'àcid glicirretínic i el H-7, en combinació amb TPA. Vam comprovar que la presència de cadascun d'aquests inhibidors comportava una disminució de l'efecte produït pel TPA (Fig. 3).

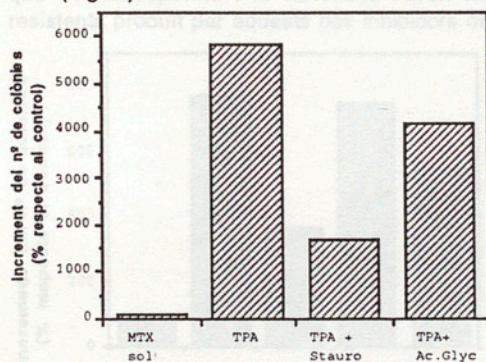


FIGURA 3.- Contrarestació per staurosporina (5×10^{-9} M) i Ac. glicirretínic (10^{-5} M) de la resistència al MTX incrementada pel TPA

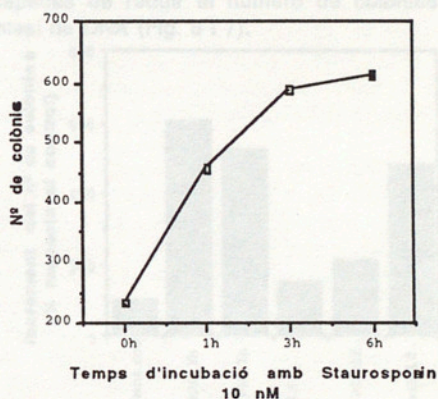


FIGURA 4.- Increment de la resistència a 3×10^{-7} M de MTX per efecte d'estaurosporina

A més, vam observar que quan s'incubaven cèl.lules CHO en presència d'estaurosporina únicament, també es produïa un augment de les colònies resistents al MTX. Es a dir, aquest inhibidor es comportava d'una manera dual pel que respecta a la resistència al MTX en funció de si actua de forma aïllada o en combinació amb un activador de l'enzim (Fig. 4). Això podria explicar-se pel fet que l'estaurosporina té la capacitat de translocar i activar la proteïna quinasa C. Per tant, per solventar els problemes associats amb la utilització de l'estaurosporina, vam procedir a experimentar un inhibidor més específic d'aquest enzim com és la calfofostina.

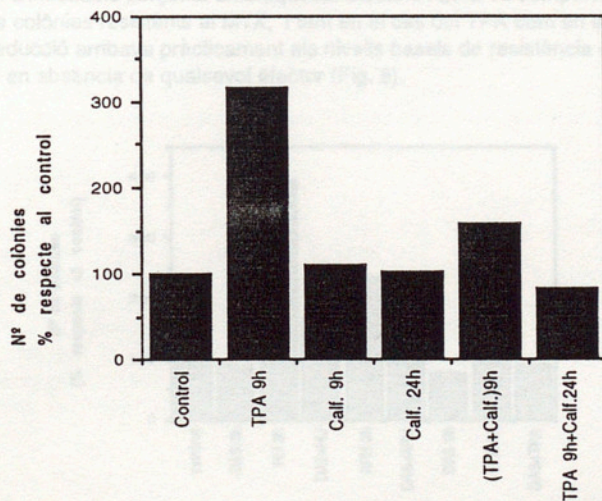


FIGURA 5. Efecte de 10^{-7} M calfofostina sobre la resistència al MTX incrementada pel TPA a 0.3 µg/ml

L'incubació de cèl.lules K1 amb calfofostina a 9h i 24h no modificà per ella mateixa la resistència al MTX, però produí un efecte de disminució del número de colònies resistents després del tractament conjunt amb TPA i aquest inhibidor de la proteïna quinasa C (Fig. 5).

Tot seguit i donat que la proteïna quinasa C pot regular l'activitat d'enzims del complex replicasa com la DNA polimerasa (Tokui et al, 1991) i la topoisomerasa I (Pommier et al., 1990), vam assajar altres efectors que inhibeixen la síntesi de DNA a diferents nivells, com la hidroxiurea (HU) (Brown et al. 1983) i l'afidicolina (APH), i que incrementessin l'aparició de colònies resistents al MTX. Tant per a l'afidicolina com per a la hidroxiurea vam obtenir un gran augment en el número de cèl.lules CHO resistents al MTX i en aquesta direcció vam comprovar que l'estaurosporina i la calfofostina eren també capaces de reduir el número de colònies resistents produït per aquests dos inhibidors de la síntesi de DNA (Fig. 6 i 7).

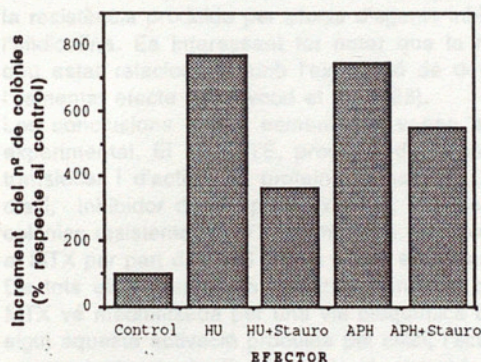


FIGURA 6. Efecte de $5 \times 10^{-9}M$ de estaurosporina sobre l'increment de la resistència al MTX generat per 3mM HU i $3 \mu g/ml$ APH

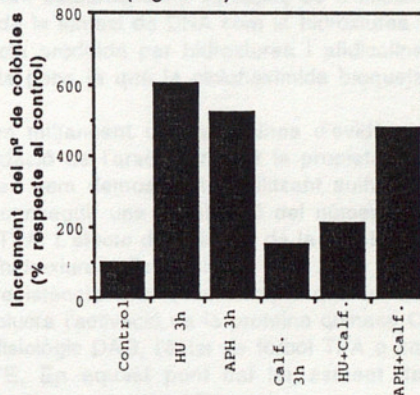


FIGURA 7. Efecte de calfofostina $10^{-7}M$ sobre l'increment de la resistència a MTX generat per HU i APH

El 12-HETE, un derivat fisiològic de l'araquidonat per acció de les lipoxigenases, té la capacitat de translocar la proteïna quinasa C i d'estimular la síntesi de DNA (Natarajan et al., 1992). Aquesta darrera propietat pot ésser disminuïda per acció d'inhibidors de la proteïna quinasa C. En aquesta direcció, vam assajar l'efecte del sulfur de dialil (DAS), un inhibidor inespecífic de les lipoxigenases sobre la resistència al MTX després del tractament amb TPA, hidroxiurea i afidicolina. L'incubació conjunta amb aquests efectors i DAS va comportar una disminució en el número de colònies resistents al MTX, i tant en el cas del TPA com en el de la hidroxiurea, aquesta reducció arribava pràcticament als nivells basals de resistència que les cèl.lules K1 presenten en absència de qualsevol efectors (Fig. 8).

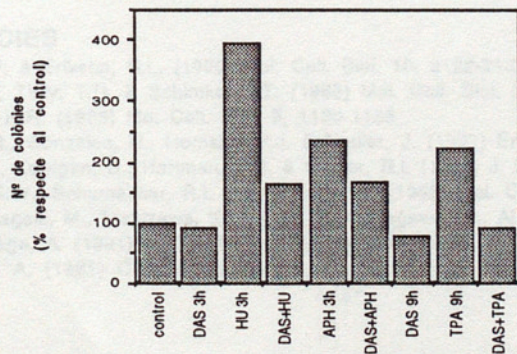


FIGURA 8. Efecte de $10^{-5}M$ de DAS sobre l'increment de resistència al MTX generat per tractament amb 3mM HU, $3 \mu g/ml$ APH i $0.3 \mu g/ml$ TPA durant els temps indicats

DISCUSSIO

Hem comprovat que l'éster de forbol TPA incrementa la resistència en cèl.lules K1 i que aquest procés té lloc a través de reaccions depenents de calci i de la proteïna quinasa C ja que la resistència també es produeix mitjançant incubació amb ionòfors de calci (A23187 i ionomicina) o amb inhibidors metabòlics com el dinitrofenol que mobilitza el calci des del retícle endoplàsmic. A més, la resistència és disminuïda quan s'afegeix EGTA al medi de cultiu de cèl.lules tractades amb TPA. D'altra banda, diferents inhibidors de la proteïna quinasa C (calfostina, estaurosporina, àcid glicirretínic i H-7) són capaços de disminuir la resistència cel.lular. Es destaca aquesta propietat en el cas de l'àcid glicirretínic ja que es tracta d'un producte natural, derivat de la regalèssia amb baixa toxicitat. També hem demostrat que l'inhibició de la proteïna quinasa C mitjançant calfofostina i estaurosporina és capaç de disminuir la resistència produïda per efecte d'agents inhibidors de la síntesi de DNA com la hidroxiurea i l'afidicolina. És interessant fer notar que la resistència produïda per hidroxiurea i afidicolina deu estar relacionada amb l'expressió de determinats gens ja que la cicloheximida bloqueja l'esmentat efecte (Sherwood et al. 1988).

Les conclusions abans esmentades venen abonades mitjançant una altra línia d'evidència experimental. El 12-HETE, producte de la lipoperoxidació de l'araquidonat té la propietat de translocar i d'activar la proteïna quinasa C. Nosaltres hem demostrat tot utilitzant sulfur de dialil, inhibidor de la lipoperoxidació, que es pot aconseguir una disminució del número de colonies resistents al MTX estimulades per l'acció del TPA. L'efecte de reducció de la resistència al MTX per part del DAS també s'obté en el cas de la hidroxiurea i l'afidicolina.

De tots els experiments realitzats concluïm que la resistència a la quimioteràpia que utilitza MTX ve mediatitzada per una via bioquímica que involucra l'activació de la proteïna quinasa C, sigui aquesta activació produïda pel calci, l'activador fisiològic DAG, l'éster de forbol TPA o per un producte de la lipoperoxidació com el 12-HETE. En aquest punt cal fer esment del comportament de les cèl.lules TNR9, una línia cel.lular variant de 3T3, que no presenten resistència per amplificació davant l'incubació amb TPA (Herschman, 1985). L'anàlisi d'aquestes cèl.lules va demostrar que les esmentades cèl.lules presenten només el 10-15% de l'activitat fosforiladora normal de la proteïna quinasa C (Bieman & Erickson, 1990).

En resum, demostrem que la resistència al tractament amb metotrexat pot ésser reduïda per l'acció d'inhibidors directes de la proteïna quinasa C o disminuint la concentració de metabòlits que activen l'enzim. Aquest efecte de reducció pot servir com a base pel disseny d'un nou tipus de protocol de quimioteràpia, en què l'agent quimioteràpic es podria administrar combinat amb un modulador (inhibidor) de la resistència, que bé podria ésser un inhibidor de l'activitat de la proteïna quinasa C.

AGRAIMENTS.

Aquest treball ha estat subvencionat pel FISs nº 92/0775

V. Noé va gaudir d'un ajut d'iniciació a la investigació per part de la C.I.R.I.T.(1992) i és becària del Plan de Formació de Investigadores del Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCIES

- Bieman, H.P. & Erikson, R.L. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2122-2132
- Brown, P.C., Tlsty, T.D. & Schimke, R.T. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1097-1107
- Herschman, H.R. (1985) Mo. Cell. Biol. 5, 1130-1135
- Natarajan, R., Gonzales, N., Hornsby, P.J. & Nadler, J. (1992) Endocrinology 131(3), 1174-1180
- Pommier, Y., Kerrigan, D., Hartman, K.D. & Glazer, R.I. (1990) J. Biol. Chem. 265, 9418-9422
- Sherwood, S.W., Schumacher, R.I. & Schimke, R.T. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2822-2827
- Tokui, T., Inagaki, M., Nishizawa, K., Yatani, R., Kusagawa, M., Ajiro, K., Nishimoto Y., Date, T. & Matsukage, A. (1991) J. Biol. Chem. 266, 10820-10822
- Varshavsky, A. (1981) Cell 25, 561-572