

ÍNDICE

	página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Terapia antitumoral	5
2. Beta-lapachona	9
3. Levadura como sistema modelo para el estudio de drogas antitumorales	14
4. Puntos de control de daño al ADN y ciclo celular	17
Organización y arquitectura de las rutas de control de daño al ADN	19
Detección del daño al ADN	25
Transducción de la señal de daño al ADN a los efectores	31
Eventos posteriores a la activación de las rutas de control: recuperación y adaptación	34
5. La ruta de control traduccional y sus implicaciones en cáncer	37
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Cultivo y manipulación celular	49
1.1 Bacterias	49
1.2 Levaduras	49
2. Preparación de drogas y tratamientos	58
2.1 Preparación de drogas	58
2.2 Ensayos de sensibilidad a drogas	59

3. Técnicas de transferencia génica	61
3.1 Preparación de células competentes de bacteria	61
3.2 Transformación en bacterias	62
3.3 Transformación el levaduras	62
4. Técnicas de manipulación génica	64
4.1 Generación de plásmidos	64
4.2 Generación de la cepa mutante <i>GCN2^c</i>	64
5. Obtención de extractos proteicos	67
5.1 Extractos proteicos de levadura para transferencia a membrana	67
6. Electroforesis y técnicas de detección de proteínas	68
6.1 Electroforesis de proteínas	68
6.2 Transferencia a membrana	68
6.3 Tinción de geles con Ponceau S	69
6.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana	69
7. Genómica funcional	71
7.1 Extracción y marcaje del ARN de levadura	71
7.2 Micromatrices, hibridizaciones y análisis de las imágenes	71
7.3 Análisis de los genes con cambios en expresión de significancia estadística	72
RESULTADOS	75
1. Caracterización de los efectos de beta-lapachona en levaduras	77
1.1 Efectos sobre crecimiento y viabilidad celular	77
1.2. Efectos sobre el ciclo celular	77

1.3. Sensibilidad de cepas mutantes con defectos en las rutas de control	82
1.4. Papel de Mec1p y Tel1p en el mecanismo de control activado por beta-lapachona	84
1.5. Papel de las vías de reparación al daño al ADN en la toxicidad de beta-lapachona	87
1.6. Implicación del complejo XMR en la toxicidad de beta-lapachona	90
1.7. Relaciones epistáticas	92
1.8. Fosforilación de un componente del complejo XMR	94
2. Análisis de la implicación de topoisomerasas	97
3. Radicales libres	101
3.1. Producción de radicales libres por tratamiento con beta-lapachona	101
3.2. Contribución de los radicales libres a la viabilidad	103
3.3. Producción de radicales libres y control de ciclo celular	103
3.4. Deshidrogenasas de levadura	105
3.5. Análisis de la producción de ROS en mutantes en actividad deshidrogenasa	107
4. Caracterización del mutante $\Delta nde2$	109
4.1. Estudios de la tolerancia del mutante $\Delta nde2$ en distintas fuentes de carbono	109
4.2. Análisis de la respuesta de control del mutante $\Delta nde2$	111
4.3. Fosforilación de RAD53 e Histona H2A en el mutante $\Delta nde2$	112
4.4 Sinergismos con otros agentes genotóxicos	

e implicación de <i>NDE2</i>	115
4.5. Respuesta de $\Delta nde2$ a otros lesionantes	117
4.6. Respuestas de los mecanismos de control del mutante $\Delta nde2$ a phleomicina	119
4.7. Nde2p y el sistema de reparación de DSB	121
Beta-lapachona y la ruta de control general de nutrientes	125
5.1. Genómica funcional con beta-lapachona	125
5.2. Beta-lapachona y la ruta de control traduccional	128
5.3. Análisis de la implicación de la ruta <i>GCN</i> en las respuestas activadas por beta-lapachona	130
5.4. Respuestas de las vías de control en mutantes en la ruta de control traduccional	134
5.5. Activación de la ruta de control traduccional en mutantes con mecanismos de control defectivos	136
5.6. Beta-lapachona activa la ruta de control traduccional en una forma dependiente de Nde2p	138
DISCUSIÓN	141
1. Beta-lapachona es citotóxica en levadura y activa un punto de control dependiente de Mre11p y Tel1p	143
2. Generación de radicales libres y sus efectos sobre la citotoxicidad de beta-lapachona en levadura	148
3. Nde2p modula la toxicidad de beta-lapachona	151
4. Beta-lapachona y la ruta de control traduccional	159
4.1. Activación de la ruta <i>GCN</i> por tratamiento con beta-lapachona	159
4.2. Implicación de la activación de la ruta <i>GCN</i>	

en los eventos activados por beta-lapachona	163
4.3. Implicación de <i>NDE2</i> en estas respuestas	165
5. Modelo de acción de beta-lapachona en levadura	166
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
ANEXOS: Artículos	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	Estructura molecular de beta-lapachona	9
2	Mecanismos de control que operan las distintas fases del ciclo celular	20
3	Respuestas de daño al ADN en fase	24
4	Detección y señalización de roturas de doble banda	30
5	Control traduccional de <i>GCN4</i>	41
6	Arrestos de ciclo celular en levadura	54
7	Generación del mutante <i>GCN2^c</i>	65
8	Efectos de beta-lapachona sobre crecimiento y viabilidad	78
9	Efectos de beta-lapachona sobre el ciclo celular	79
10	Viabilidad en las distintas fases del ciclo celular	80
11	Sensibilidad de mutantes con rutas de control defectivas	83
12	Transición G1-S en mutantes $\Delta mec1$, $\Delta tel1$ y $\Delta mec1\Delta tel1$	85
13	Fosforilación de Rad53p en mutantes $\Delta mec1$, $\Delta tel1$ y $\Delta mec1\Delta tel1$	86
14	Sensibilidad de mutantes en sistemas de reparación	88
15	Fosforilación de Histona H2A por tratamiento	89
16	Respuestas de control del mutante <i>XMR</i>	91
17	Interacciones epistáticas y funcionales entre Tel1p y Xrs2p	93
18	Fosforilación de Xrs2p	95
19	Respuestas de mutantes en topoisomerasas	99
20	Modelo de acción de NQO1	102
21	Generación de radicales libres por tratamiento con beta-lapachona	102
22	Generación radicales libres y toxicidad de beta-lapachona	104

23	Radicales libres y respuestas de las rutas de control	105
24	Sensibilidad de mutantes en actividad deshidrogenasa	106
25	Generación de ROS en mutantes en actividad deshidrogenasa	108
26	Tolerancia del mutante $\Delta nde2$	110
27	Progresión de ciclo celular del mutante $\Delta nde2$	113
28	Fosforilación de Rad53p e Histona H2A en $\Delta nde2$	114
29	Sinergismos	116
30	Respuestas de $\Delta nde2$ a otros lesionantes	118
31	Respuestas de $\Delta nde2$ a phleomicina	120
32	Eficiencia de reparación del mutante $\Delta nde2$	123
33	Fosforilación de eIF2 α por tratamiento con beta-lapachona	129
34	Mutantes en la ruta GCN y beta-lapachona	132
35	Sensibilidad del mutante GCN2 ^c	133
36	Modulación de las respuestas de las vías de control por la ruta GCN	135
37	Activación de la ruta GCN en mutantes de control	137
38	Fosforilación de eIF2 α en el mutante $\Delta nde2$	139
39	Mecanismo de activación de E2F	147
40	Modelo de señalización y reparación del daño al ADN	153
41	Modelo propuesto del mecanismo de acción de beta-lapachona en levaduras	167

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		página
1	Proteínas de respuesta al daño al ADN en eucariotas	23
2	Lista de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	56
3	Lista de plásmidos	63
4	Lista de anticuerpos	70
5	Genes diferencialmente inducidos por tratamiento con beta-lapachona	126
6	Genes diferencialmente reprimidos por tratamiento con beta-lapachona	127