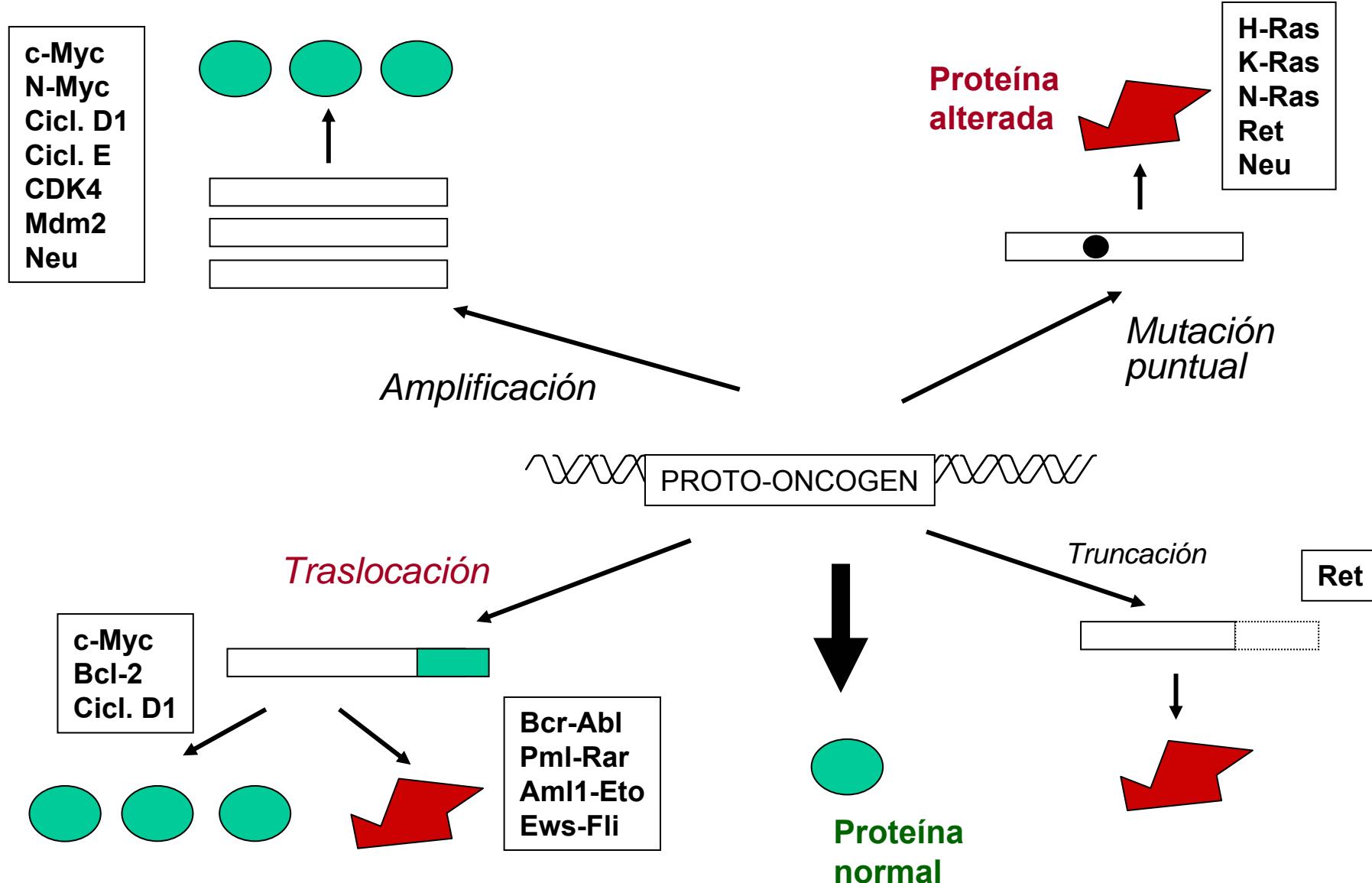


Curso de fármacos antitumorales
ICIC-2006
TENERIFE

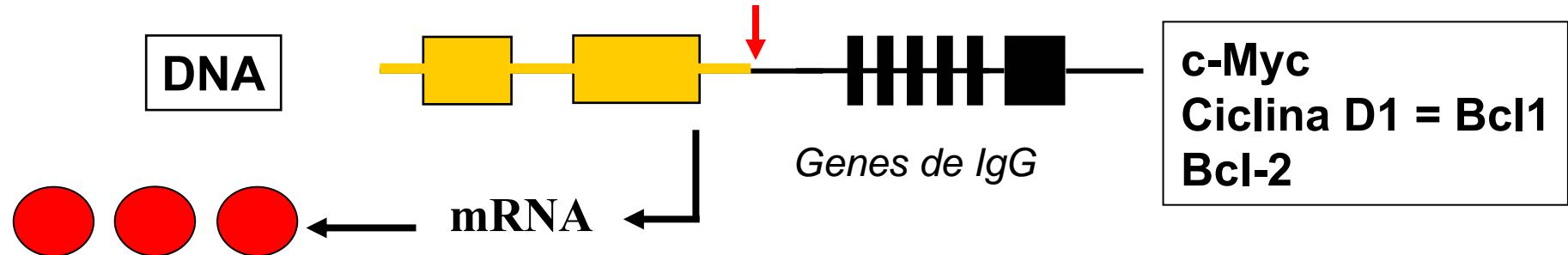
**Terapia antitumoral y productos de
traslocación oncogénicos**
1^a parte: PML-RAR α , ALL1, EWS

Javier León (Universidad de Cantabria)
27 de Julio 2006

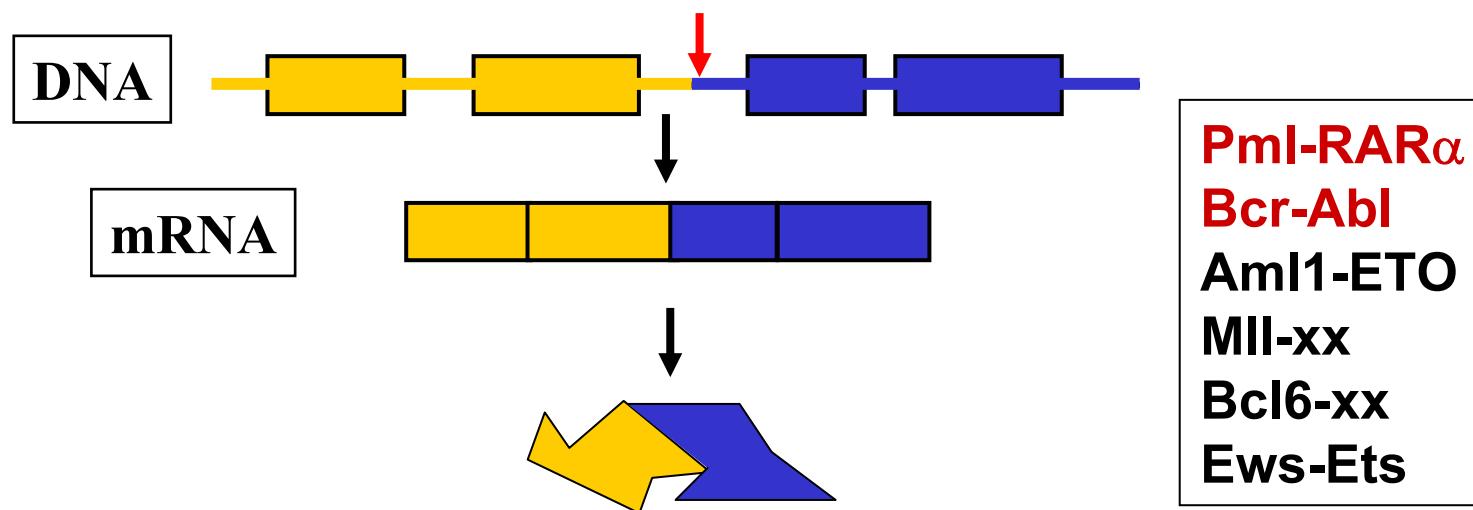
Mecanismos de activación de proto-oncogenes



Sobreexpresión de genes por traslocación al locus de IgG o TCR



Generación de proteínas de fusión por traslocación cromosómica



Asociación de oncogenes con cáncer humano

ASOCIACIÓN MODERADA: 20-70% de casos

Oncogén	Tumor	Proteína
<i>N-ras</i>	Leucemia mieloide aguda	Proteína G pequeña
<i>fms</i>	Leucemia mieloide aguda	Receptor M-CSF
<i>all-1</i>	Leucemias agudas	Factor de transcripción
<i>aml1-eto</i>	Leucemia mieloide aguda	Factor de transcripción
<i>tel-aml1</i>	Leucemia linfocítica aguda	Factor de transcripción
<i>flt3</i>	Leucemia mieloide aguda	Receptor TQ de FLT3-L
<i>bcl-6</i>	Linfoma difuso cel. Grandes	Factor de transcripción
<i>K-ras</i>	Carcinoma de colon	Proteína G pequeña
<i>gsp</i>	Tiroides	Proteína Gαs
<i>erb-B</i>	Glioblastomas, melanomas	Receptor TQ de EGF
<i>kit</i>	Carcinoma microcítico pulmón	Receptor TQ de SCF
<i>met</i>	Carcinoma de estómago	Receptor TQ de HGF
<i>ret</i>	Carcinoma papilar de tiroides	Receptor TQ de GDNF
<i>trk</i>	Carcinomas de tiroides	Receptor TQ de NGF
<i>neu</i>	Carcinoma de mama	Receptor TQ tipo EGF
<i>c-myc</i>	Carcinoma de mama	Factor de transcripción
<i>ciclina E</i>	Carcinoma de mama	Ciclina
<i>cdk4</i>	Melanoma, glioblastomas	CDK
<i>N-ras</i>	Melanoma	Proteína G pequeña

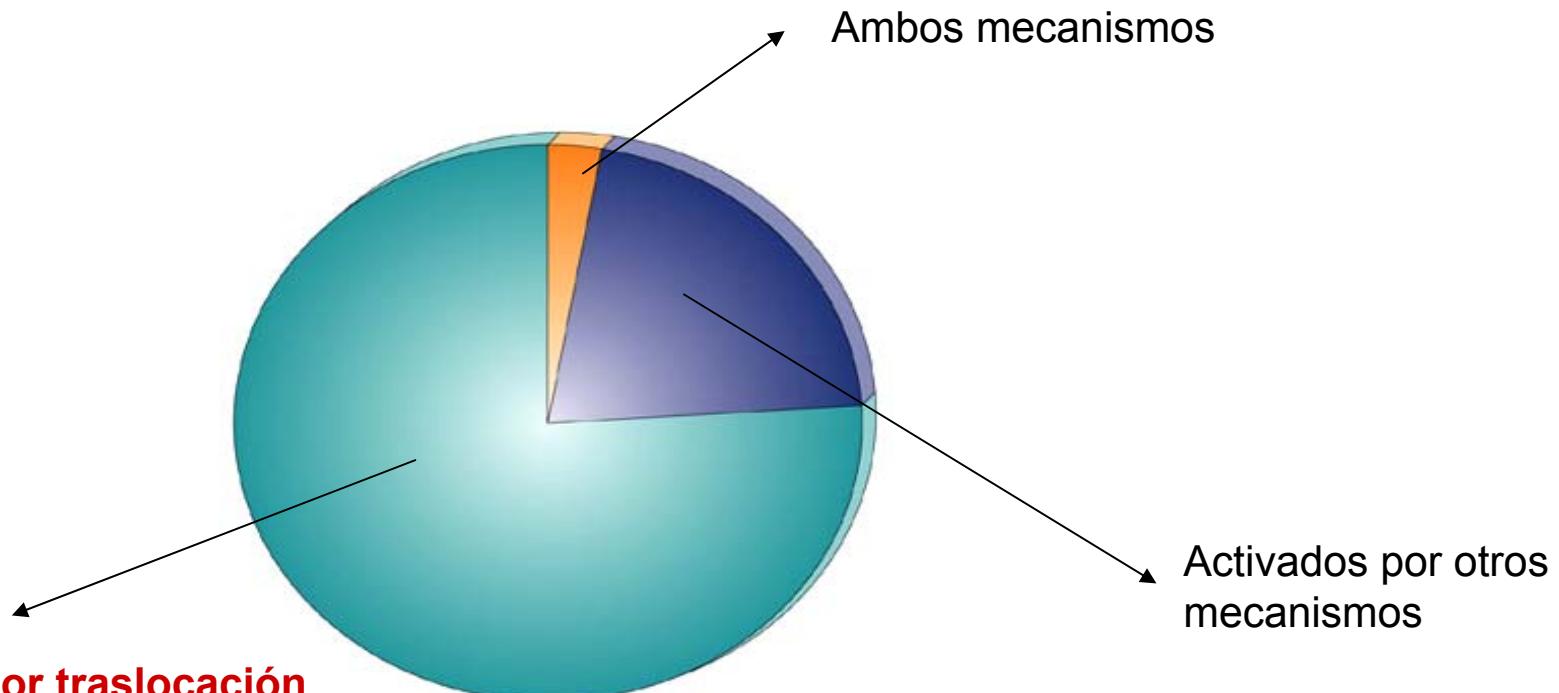
Asociación de oncogenes con cáncer humano

ASOCIACIÓN ALTA: 70-100% de casos

Oncogén	Tumor	Proteína
<i>c-myc</i>	Linfoma de Burkitt	Factor de transcripción
<i>bcr-abl</i>	Leucemia mieloide crónica	Tyr quinasa citoplásica
<i>pml-rarα</i>	Leucemia promielocítica	Receptor nuclear
<i>bcl-1</i>	Linfoma del manto	Ciclina D1
<i>bcl-2</i>	Linfoma folicular	Proteína mitocondrial anti-apoptótica
<i>N-myc</i>	Neuroblastoma	Factor de transcripción
<i>K-ras</i>	Carcin. de páncreas	Proteína G pequeña
<i>B-Raf</i>	Melanoma	Quinasa citoplásica
<i>c-myc</i>	Carcin. microcítico pulmón	Factor de transcripción
<i>c-kit</i>	Tumor estroma gastrointest.	Receptor Tyr quinasa

A CENSUS OF HUMAN CANCER GENES

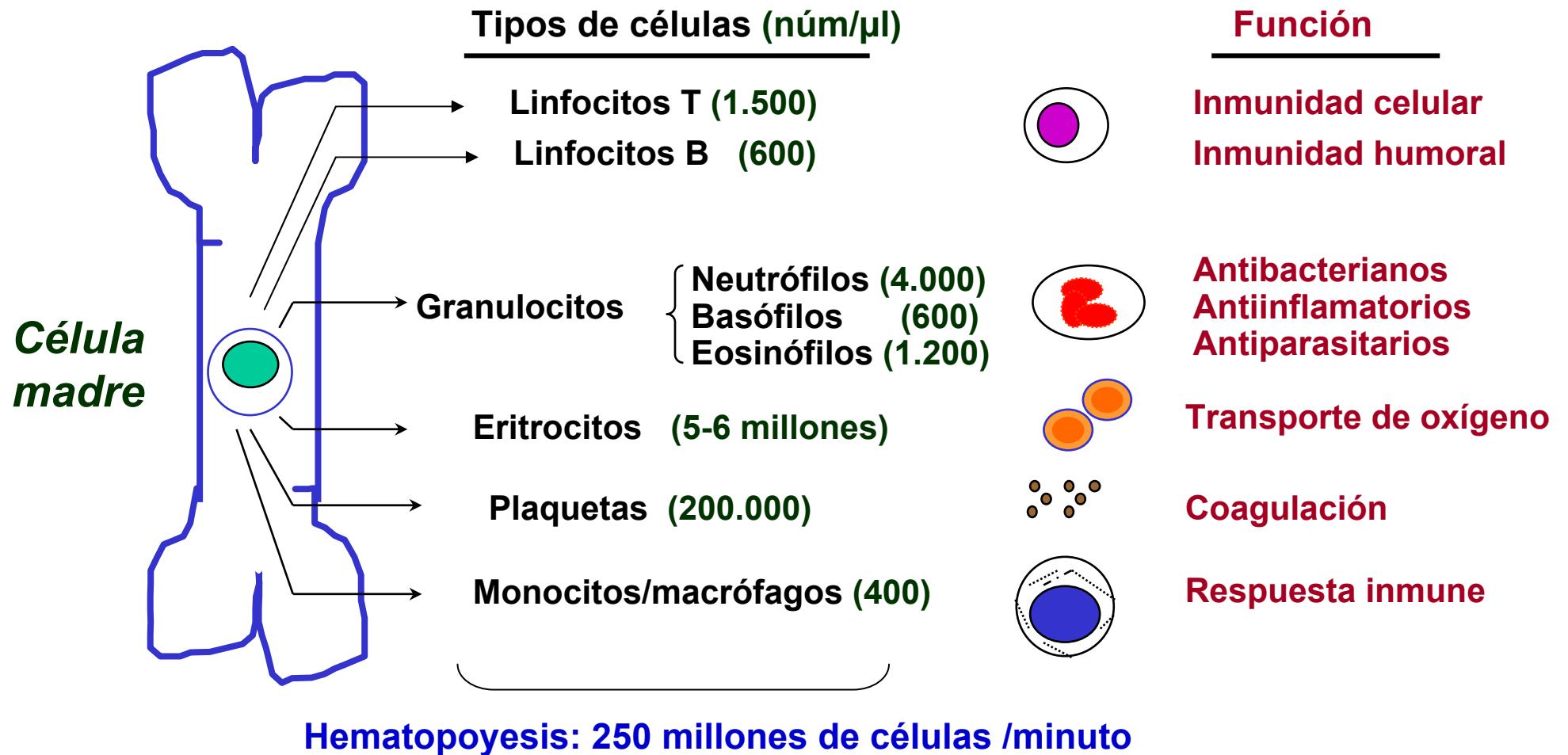
Futreal et al, Nature Rev Cancer, Marzo 2004



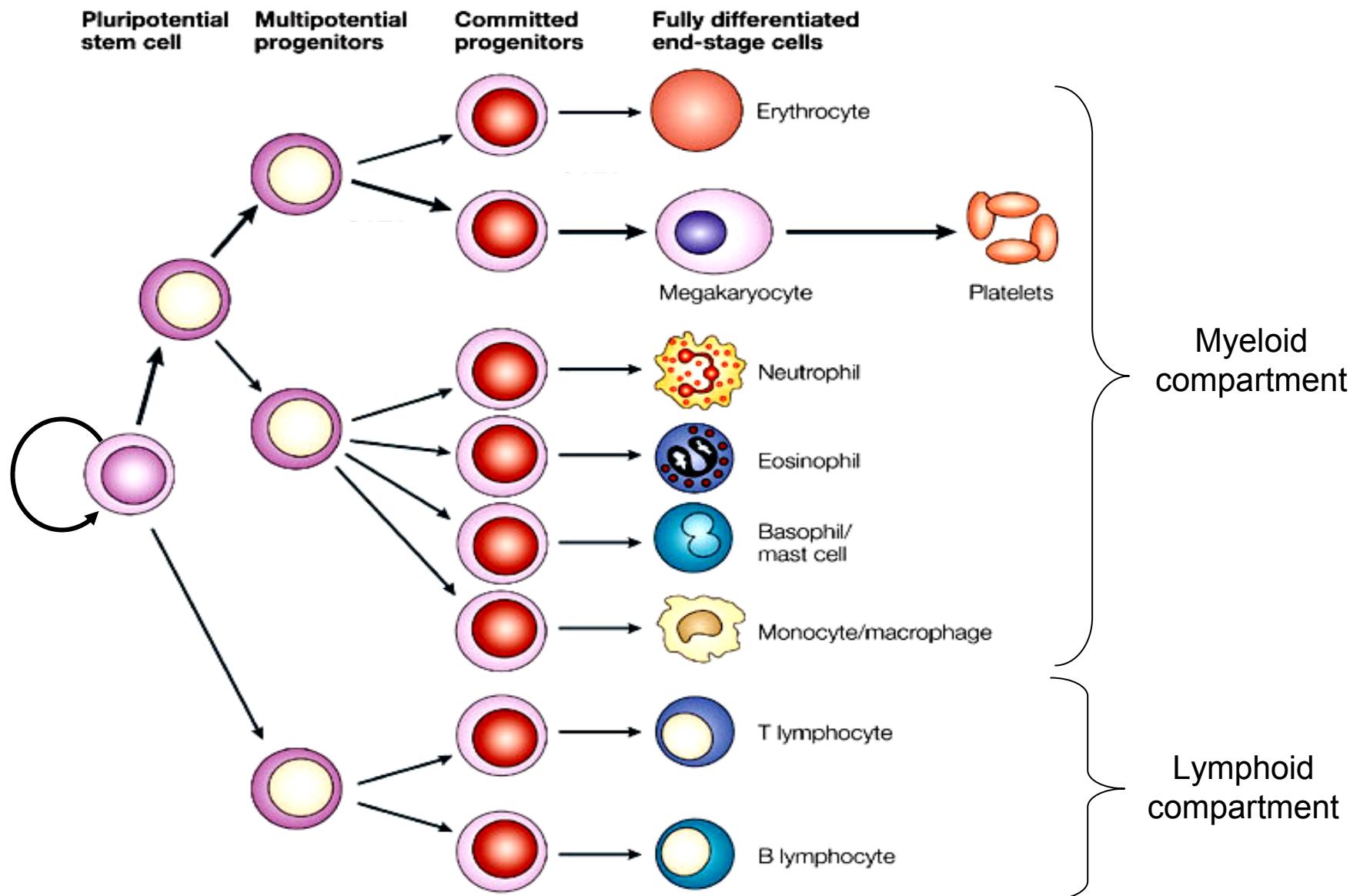
Activados por traslocación

(y casi todos ellos, descritos en leucemias/linfomas)

La hematopoyesis



Blood cell differentiation



CLASIFICACIÓN DE LEUCEMIAS (según los hematólogos, sistema FAB)

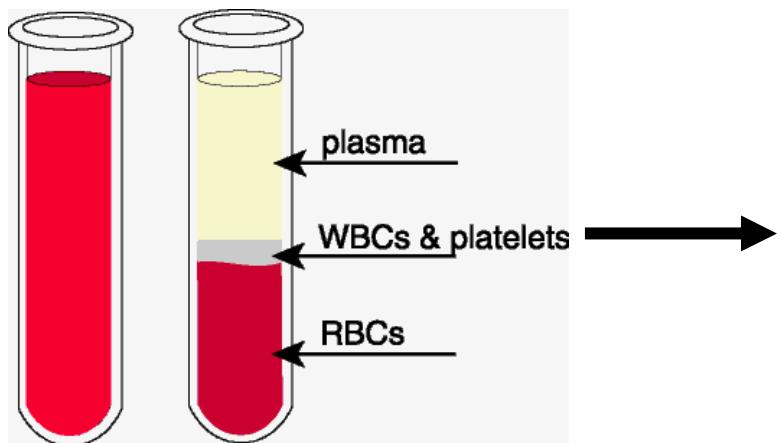
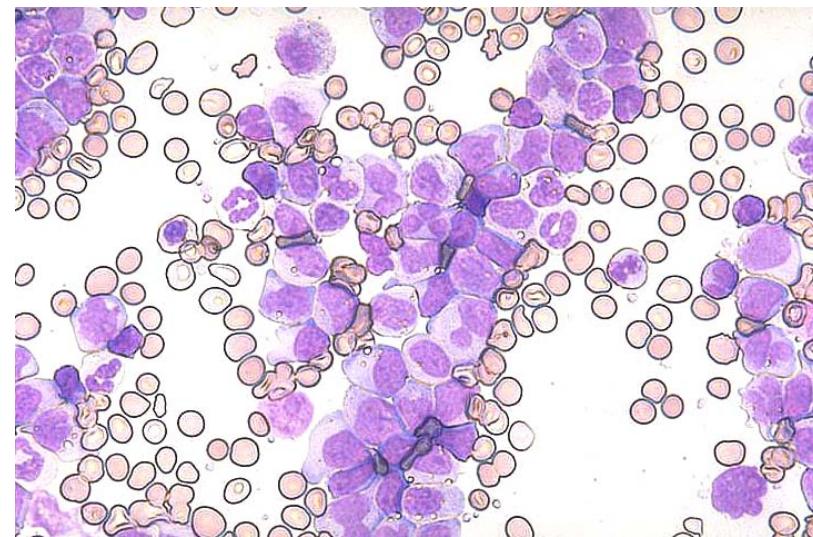
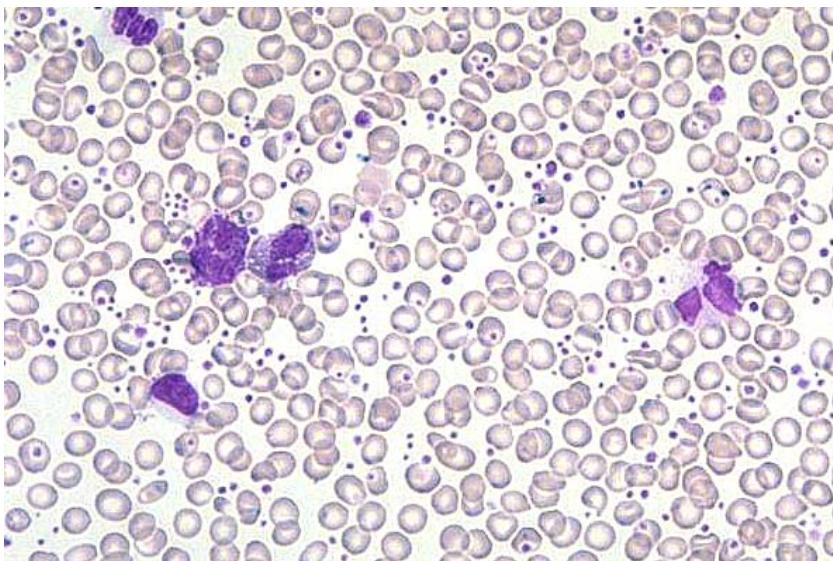
A) Leucemias mieloides

- Agudas: ocho tipos (M0-M7) (LMA) 34%
- Síndromes mieloproliferativos - mieloide crónica (LMC) 14%
- Síndromes mieloproliferativos- mielodisplasia (SMD) 16%

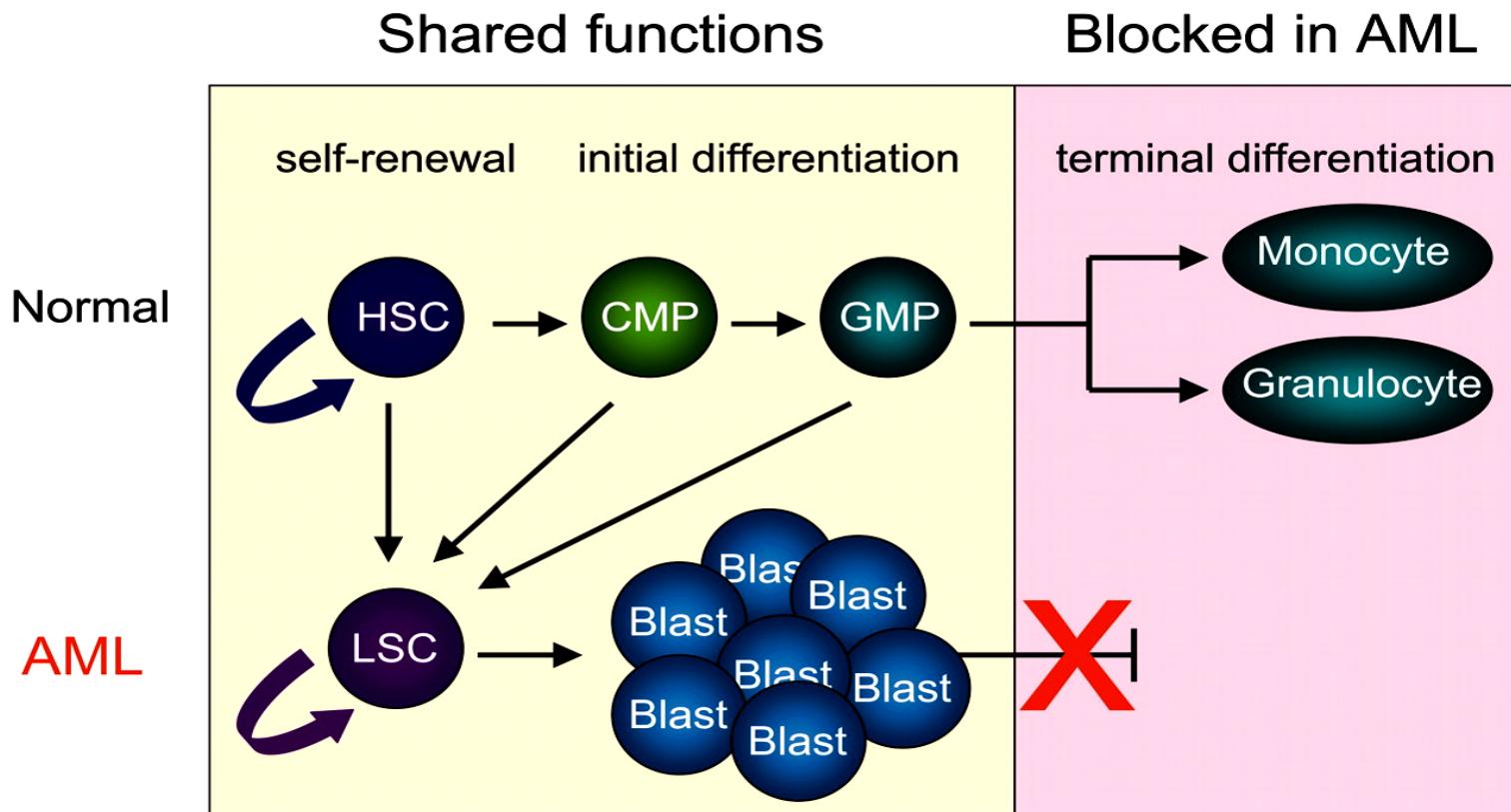
B) Leucemias linfoideas

- Linfoblástica agudas: tres tipos (L1, L2, L3))(LLA) 12%
- Linfocítica crónica (LLC) 15%

(1 caso / 20.000 / año)



Important stem-cell functions are shared by HSCs and LSCs



HSC: Hematopoietic stem cell

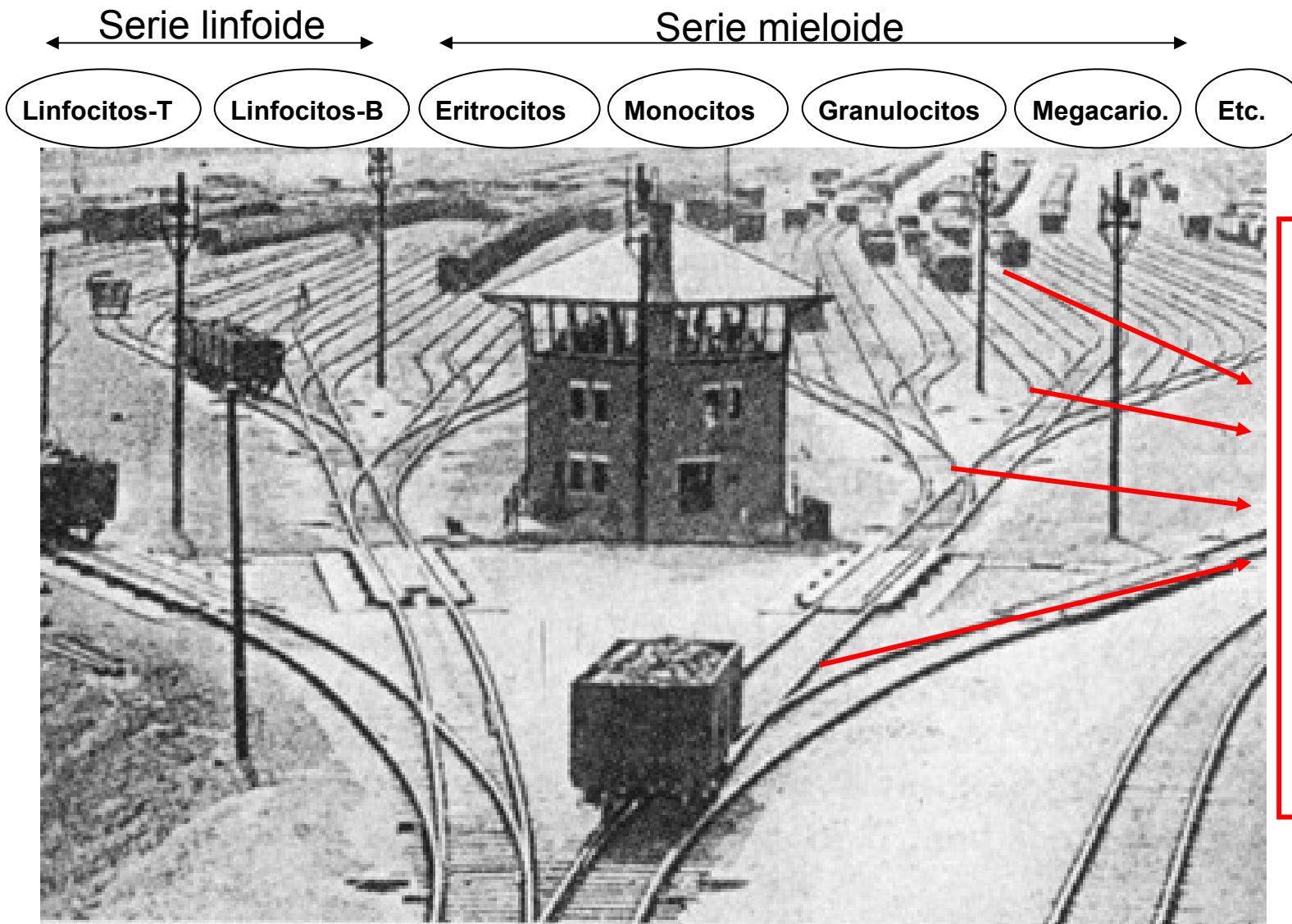
CMP: Common myeloid progenitors

LSC: Leukemia stem cell

GMP: Granulocyte-monocyte progenitors

Rosenbauer, F. et al. Blood 2005;106:1519-1524

La hematopoyesis



- Factores de transcripción leucemogénicos
- c-Myc
 - RAR α
 - PML
 - AML1
 - MLL
 - BCL6
 - NOTCH1
 - etc

Joseph Needham, 1936.

(Tomado de Gilbert, Developmental Biology, 1993)

CLASIFICACION DE LEUCEMIAS Y LINFOMAS (SEGÚN LOS BIOLOGOS MOLECULARES)

A) Las que se conoce el oncogén:

- Todas las leucemias promielocíticas (M3): *PML-RAR α*
- Todas las leucemias mieloides crónicas: *BCR-ABL*
- Todos los linfomas de Burkitt: *c-Myc*
- Casi todos los linfomas foliculares: *Bcl2*
- Casi todos los linfomas del manto: *Ciclina D1 (Bcl1)*

B) Las que no se sabe el oncogén responsable:

- El resto (aunque en casi todos los tipos aparecen oncogenes o genes supresores de tumores con frecuencias de hasta el 50%): *AML1, ALL1, Bcl6, N-ras,*

CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS

(SEGÚN LOS ENFERMOS)

A) Las que se curan casi siempre (>80%):

- Leucemia de células pilosas (**quimioterapia**)
- Leucemia promielocítica (**a.retinoico y quimioterapia**)
- Leucemia linfoblástica aguda infantil (**quimioterapia**)

B) Las que se curan bastantes veces (20-80%):

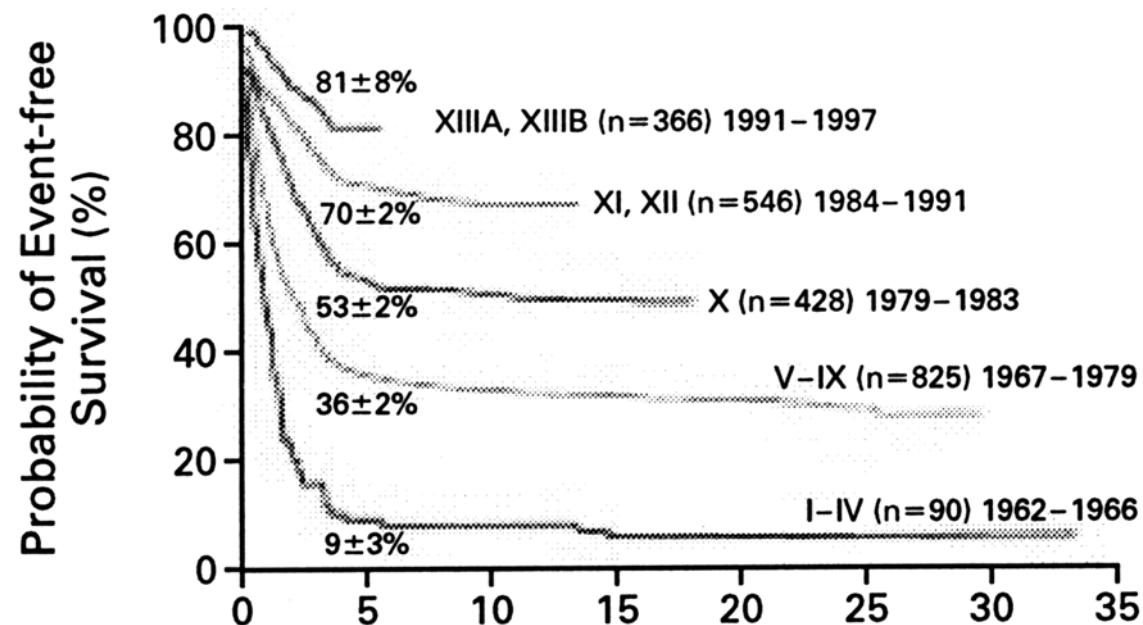
- Leucemia linfoblástica aguda del adulto (**quimioterapia y TMO**)
- Leucemia mieloblástica aguda (**quimioterapia y TMO**)
- Leucemia mieloide crónica en fase crónica (**TMO alogénico**)
- Síndromes mielodisplásicos (**TMO alogénico**)

C) Las que nunca se curan:

- Leucemia mieloide crónica en fase blástica
- Leucemia linfocítica crónica

Survival of Children with ALL

St. Jude Children's Research Hospital, 1962-1997



Pui C-H, Evans WE: NEJM, 1998

Traslocaciones en leucemia mieloide

Anomalía citogenética	Dianas moleculares
t(8;21)(q22 ;q22)	<i>AML1-ETO</i>
t(15;17)(q22 ;q21)	<i>PML-RARα</i>
inv16/t(16 ;16)(p13 ;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>
t(6;11)(p25 ;q23)	<i>MLL-AF6</i>
t(9;11)(p22 ;q23)	<i>MLL-AF9</i>
t(10;11)(p12 ;q23)	<i>MLL-AF10</i>
t(11;19)(q23 ;p13)	<i>MLL-ENL</i>
t(6;9)(q23 ;q34)	<i>DEK-CAN</i>
inv3/t(3 ;3)(q21 ;q26)	<i>EVI-1</i>
t(9;22)(q24 ;q11)	<i>BCR-ABL</i>
t(3;21)(q26 ;q22)	<i>AML1-EVI1, AML1-1AP</i>
	<i>AML1-MDS1</i>

Leucemia promielocítica = leucemia mieloide aguda tipo M3

- 5-10% de las LMA en países anglosajones
- 15-20% en España y países mediterráneos (5-7% de leucemias)
- 20-30% en Latinoamérica
- Más frecuente en adultos
- Unos de los tres tumores con alteración citogenética consistente: traslocación, t(15;17), que genera el gen PML-RAR α
- **El primer tumor tratable mediante inducción de diferenciación celular**

Historia del PML-RAR α

- 1980s: el RA diferencia líneas de leucemia en cultivo
- 1984: la traslocación t(15;17) en todos los casos de LPA (Larson, 1984)
- 1988: el RA induce remisión clínica en LPA (Huang, 1988)
- 1988: el gen RAR α es mapeado cerca del punto de traslocación
- 1990: aislamiento del gen PML-RAR α (dos años después de descubrir la terapia con RA)
- 1996: descubrimiento del As₂O₃ como agente anti-LPA
- 1998: efecto antagonista del PML-RAR α sobre la transcripción
y la diferenciación dependientes de RAR α

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

- 1 caso /10⁵ personas
- 14.000 /año en USA
- 80% de leucemias agudas en adultos

Alteraciones cromosómicas recurrentes en LMA			
FAB	Cariotipo	Genes implicados	Frecuencia
M0	inv(3q26) t(3;3)	<i>EVI1</i>	1
M2	t(8;21) t(6;9)	<i>AML1-ETO</i> <i>DEK-CAN</i>	40 1
M3	t(15;17) t(11;17)	<i>PML-RARα</i> <i>PLZF-RARα</i>	98 1
M4	11q23 inv(3q26)	<i>MLL</i> <i>EVI1</i>	20 3
M4Eo	inv (16) / t(16;16)	<i>CBFβ-MYH11</i>	80
M5	11q23	<i>MLL</i>	20
M7	t(1;22)	?	5

Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17.

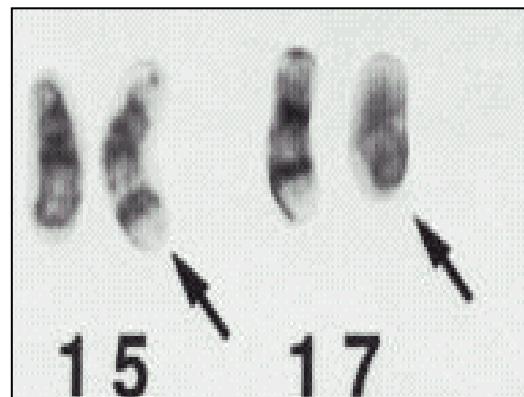
Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E
Science. 1990 Sep 28;249(4976):1577-80.

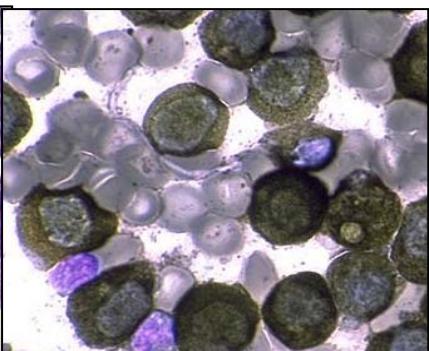
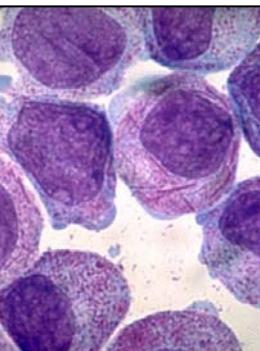
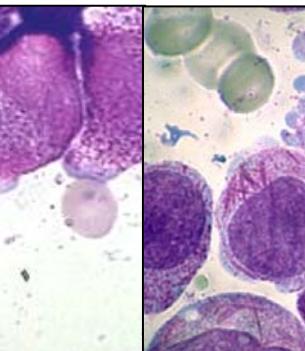
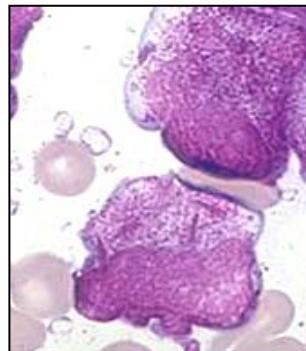
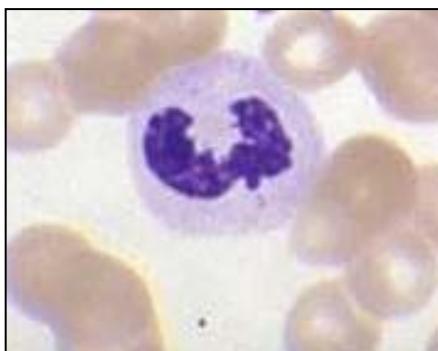
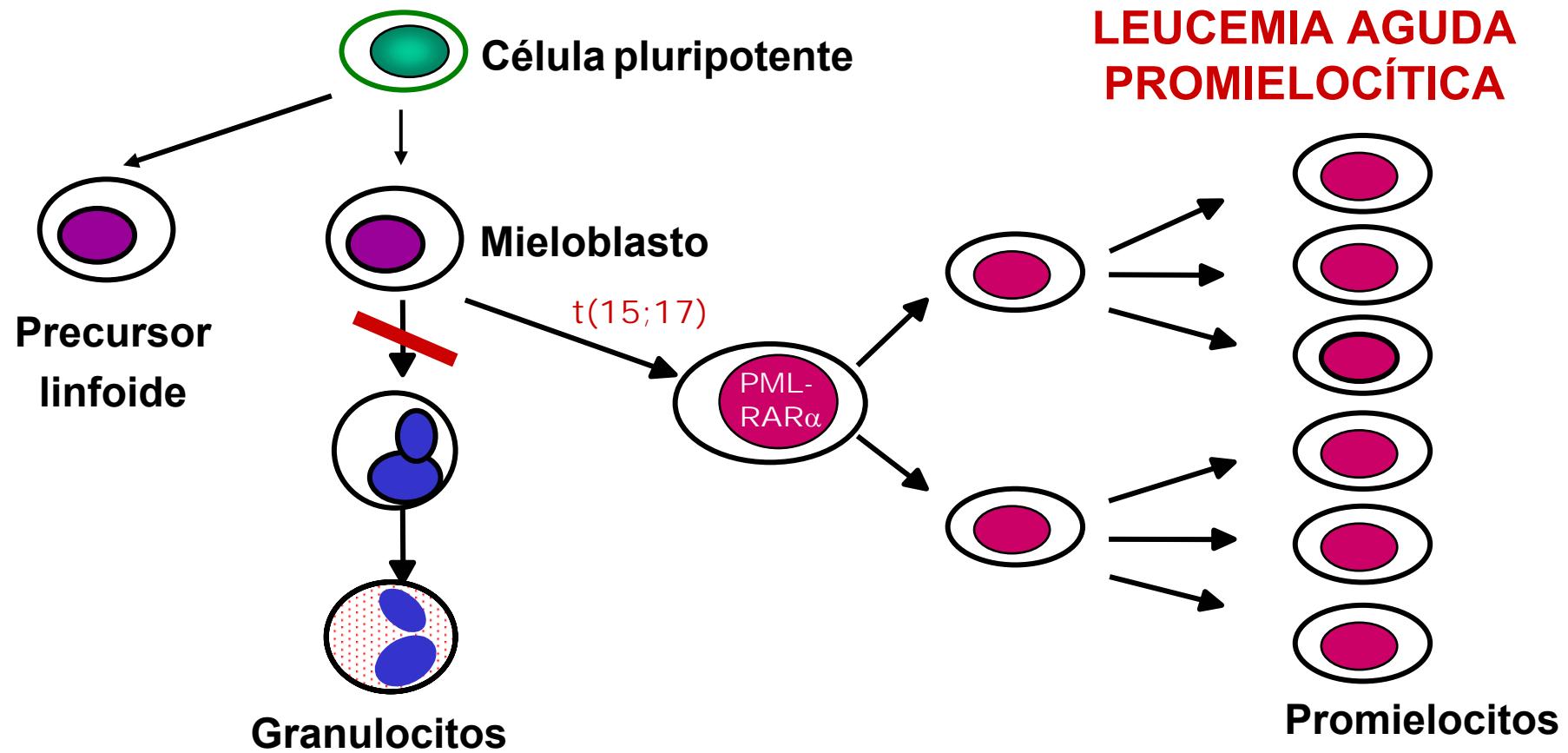
The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus.

de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A
Nature. 1990 Oct 11;347(6293):558-61.

Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus.

Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, et al
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Mar 1;88(5):1977-81.



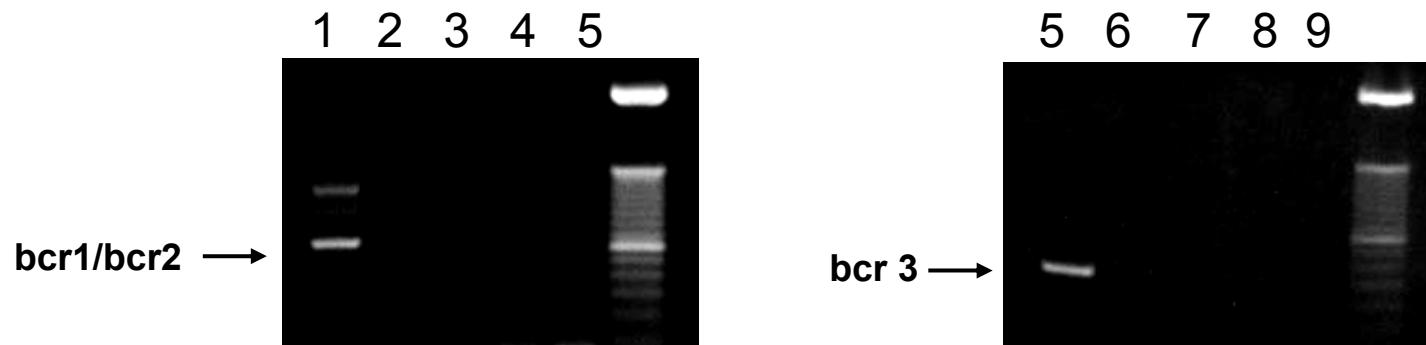
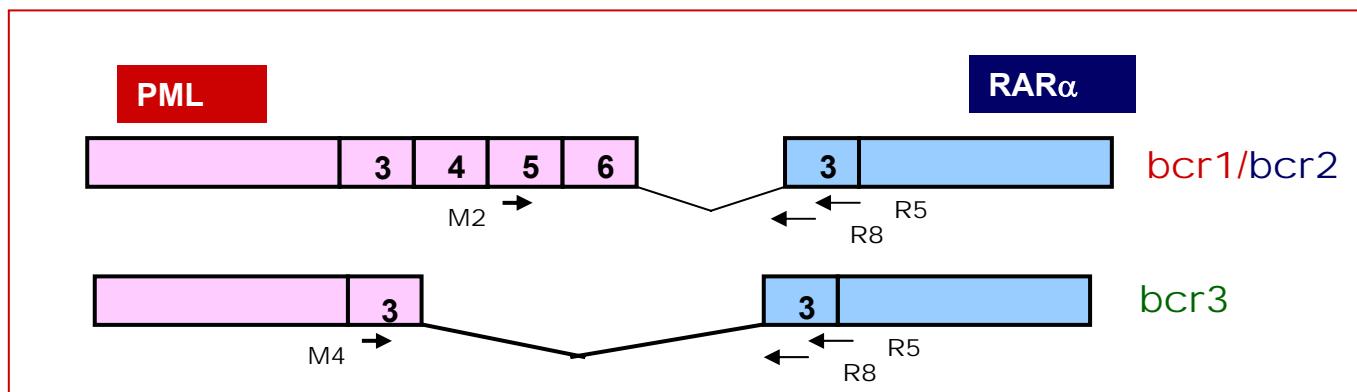
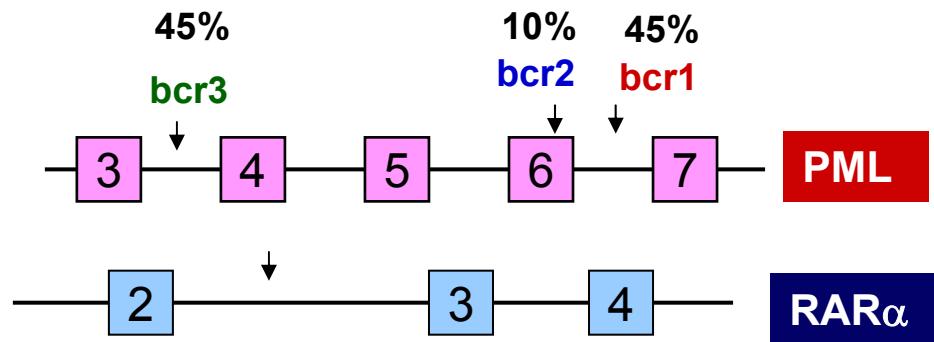


Bastones de Auer

MPO

Javier León

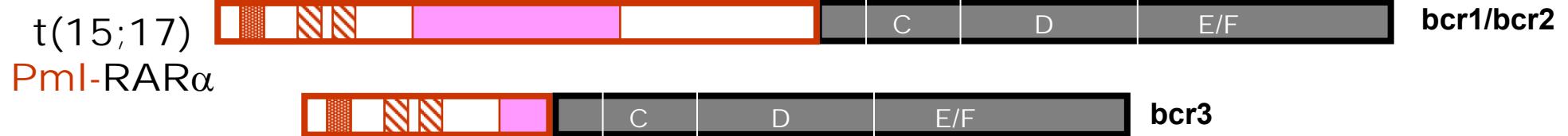
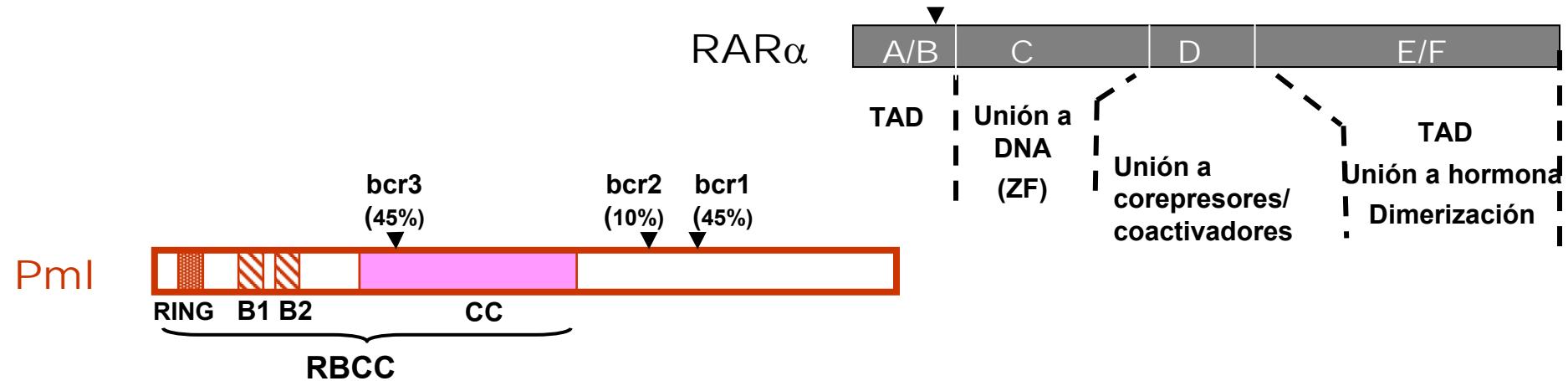
Diagnóstico molecular por RT-PCR de reordenamientos PML-RAR α



Marta Albajar,
Hosp. M. Valdecilla

Javier León

La leucemia promielocítica se asocia a la expresión de PML-RAR α

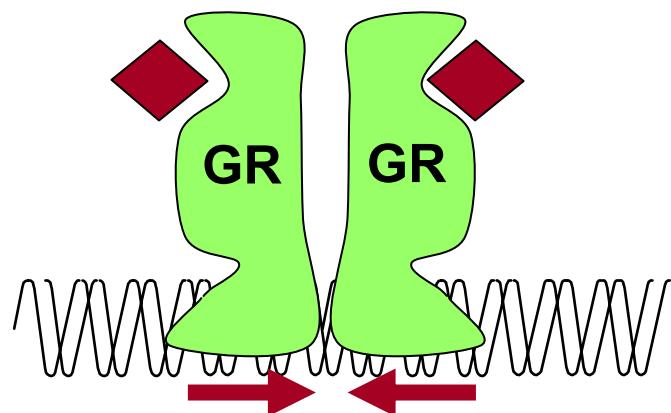


Dos tipos de receptores nucleares

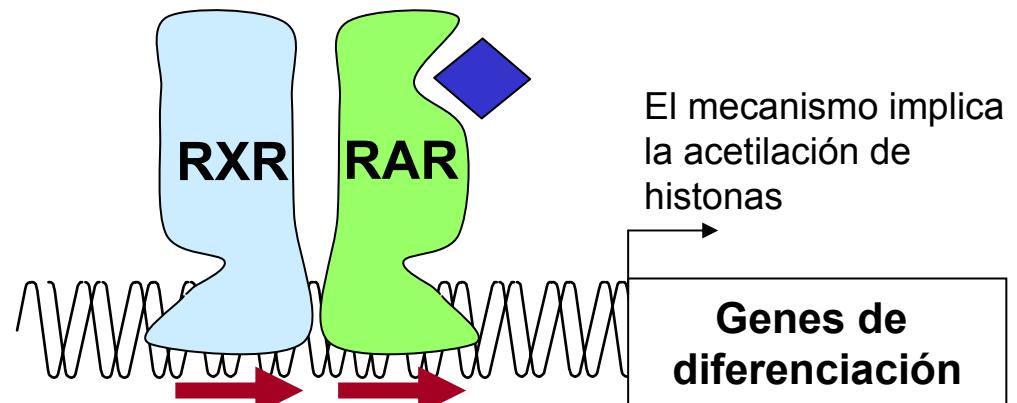
Glucocorticoides
Mineralocorticoides
Progesterona
Andrógenos
Estrógenos

All-trans-Retinoico
Hormona tiroidea
Vitamina D3
Eicosanoides (PPAR)
Ecdisona

= ATRA



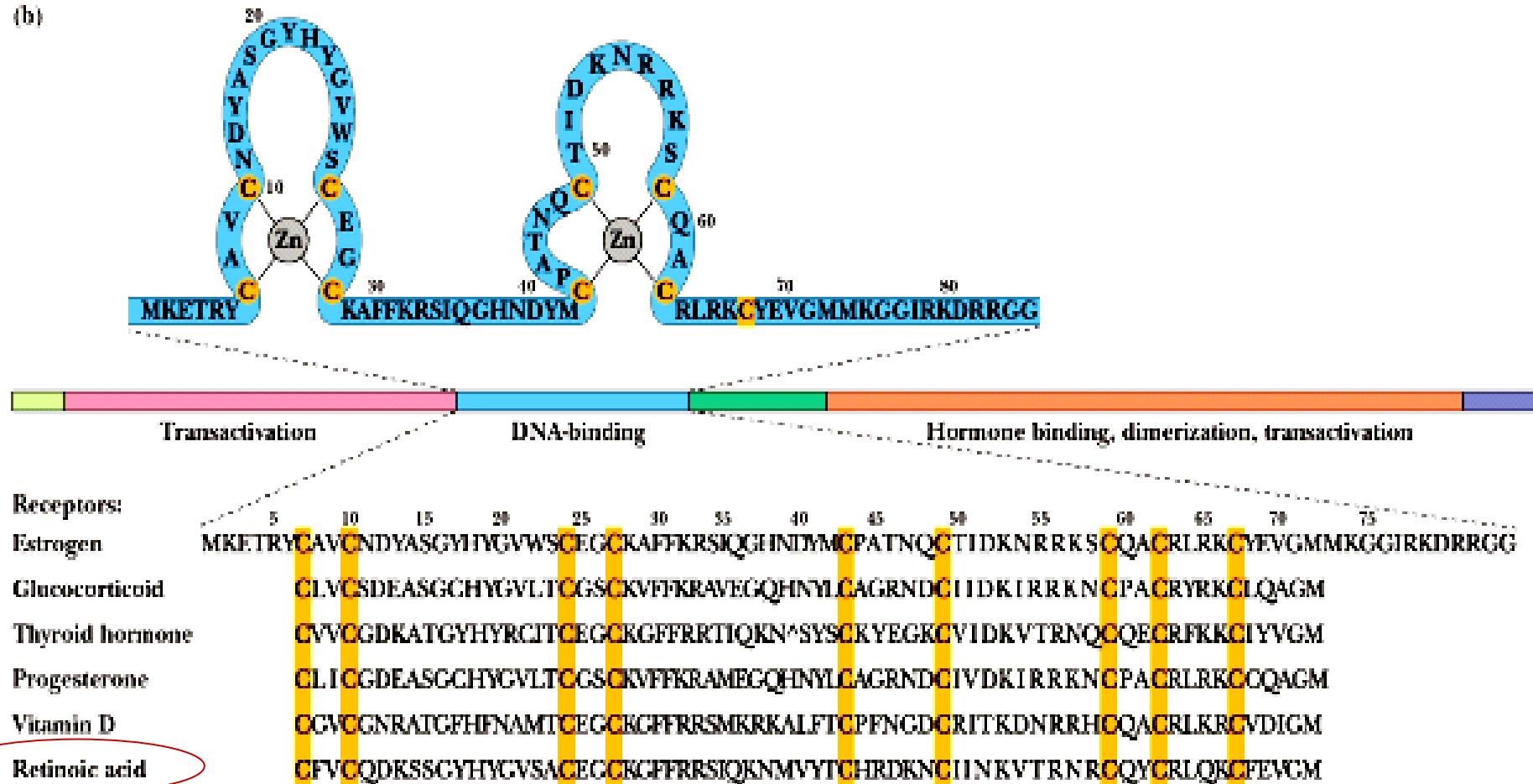
Homodiméricos



Heterodímeros con RXR

Estructura general de receptores nucleares

(b)

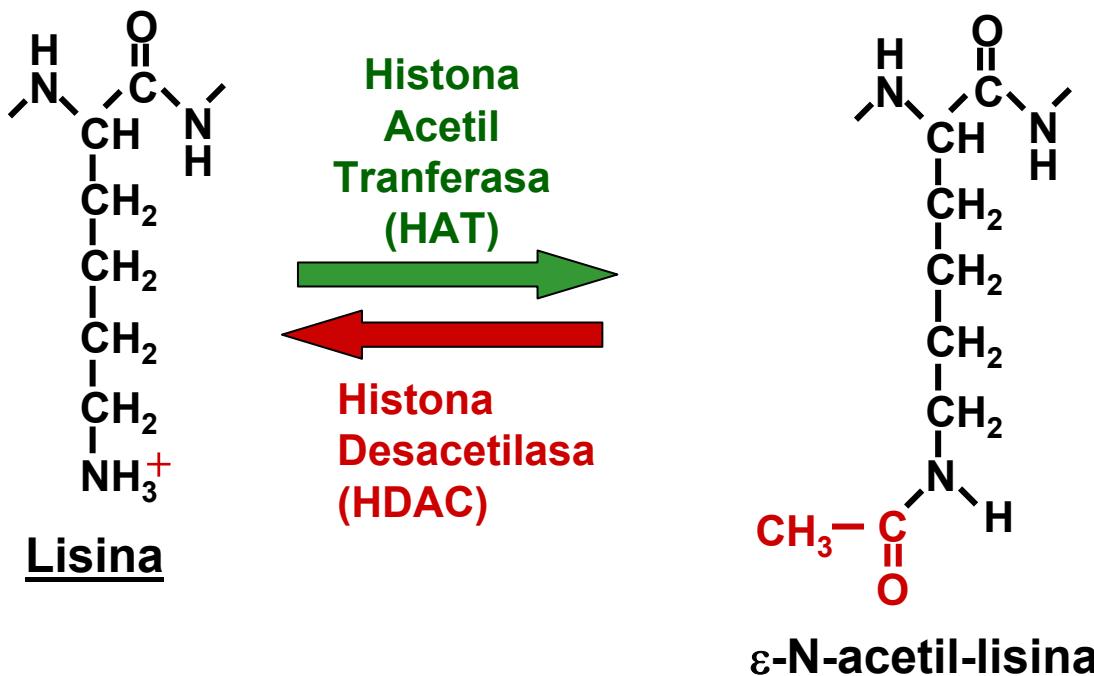


ACETILACIÓN DE LISINAS CONSERVADAS

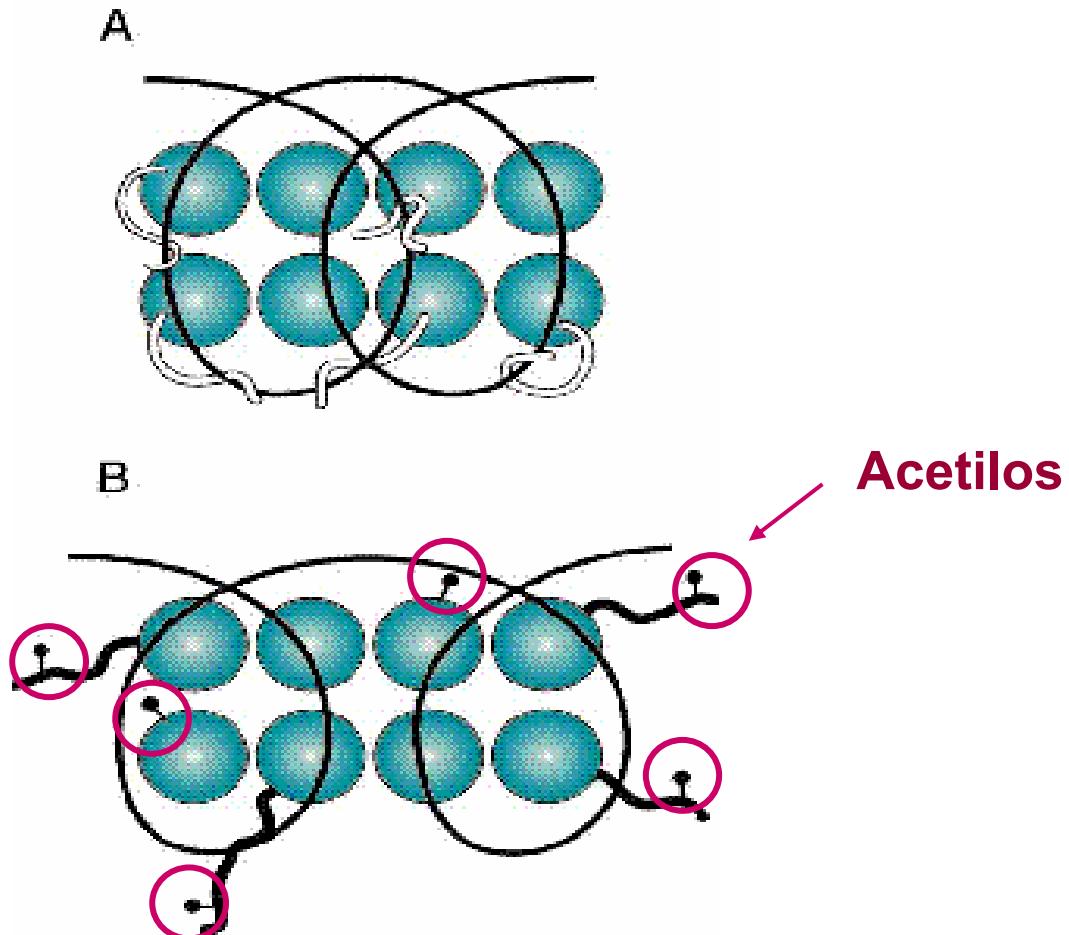
Los extremos N-terminal de H3 y H4 y sus patrones de acetilación están totalmente conservados

H4 N-ter S-G-R-G-K-G-G-K-L-G-K-G-G-A-K-R-H-R-K-V-L-R-D-

5 8 12 16 20



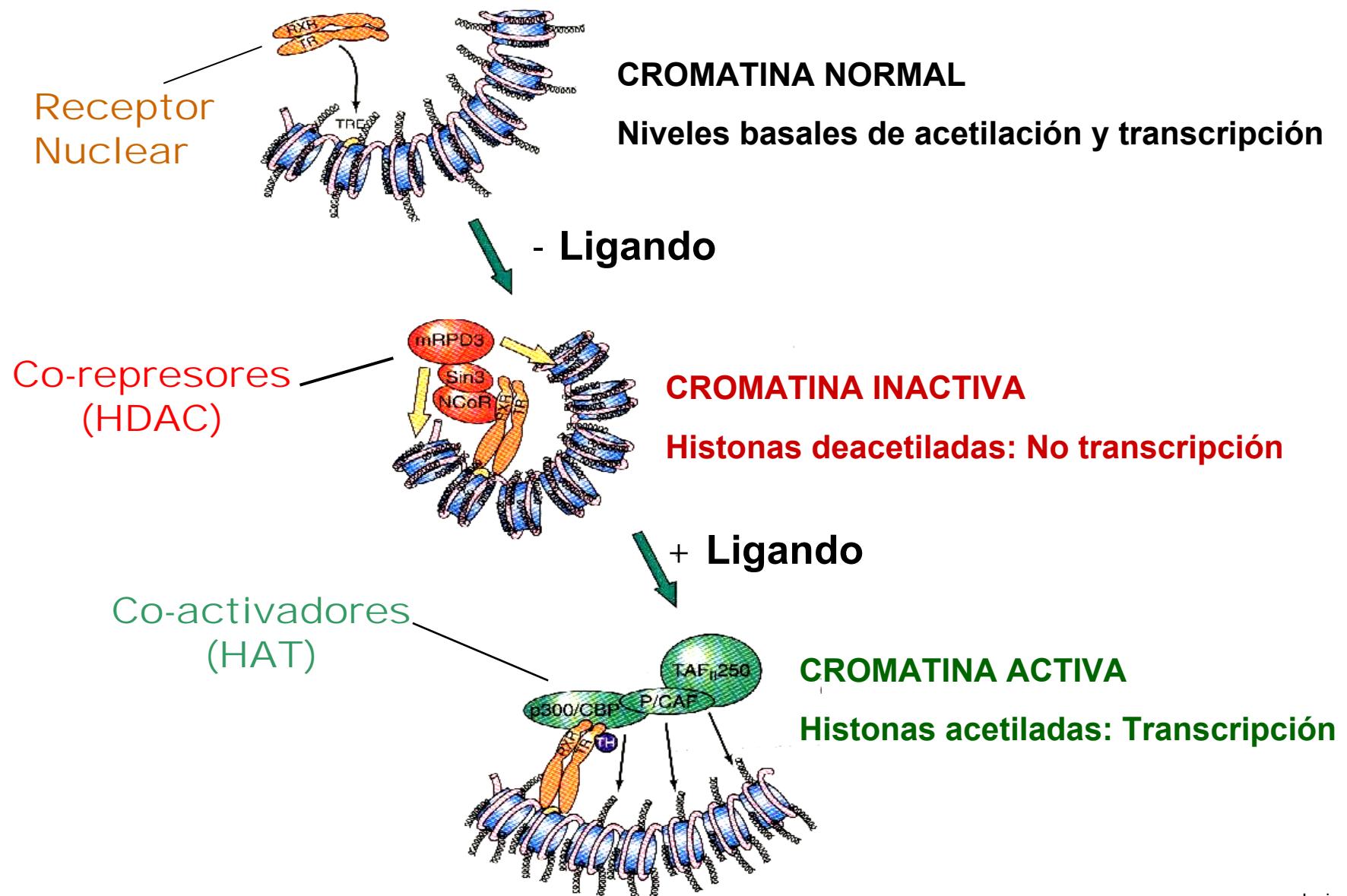
La acetilación de las “colas” de histonas permite una configuración más abierta de la cromatina y facilita la expresión génica



(Redner et al. Blood 94:417, 1999)

Javier León

Activación y represión génicas por receptores nucleares



Blood 1988 Aug;72(2):567-72

Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhoa L, Gu LJ, Wang ZY.

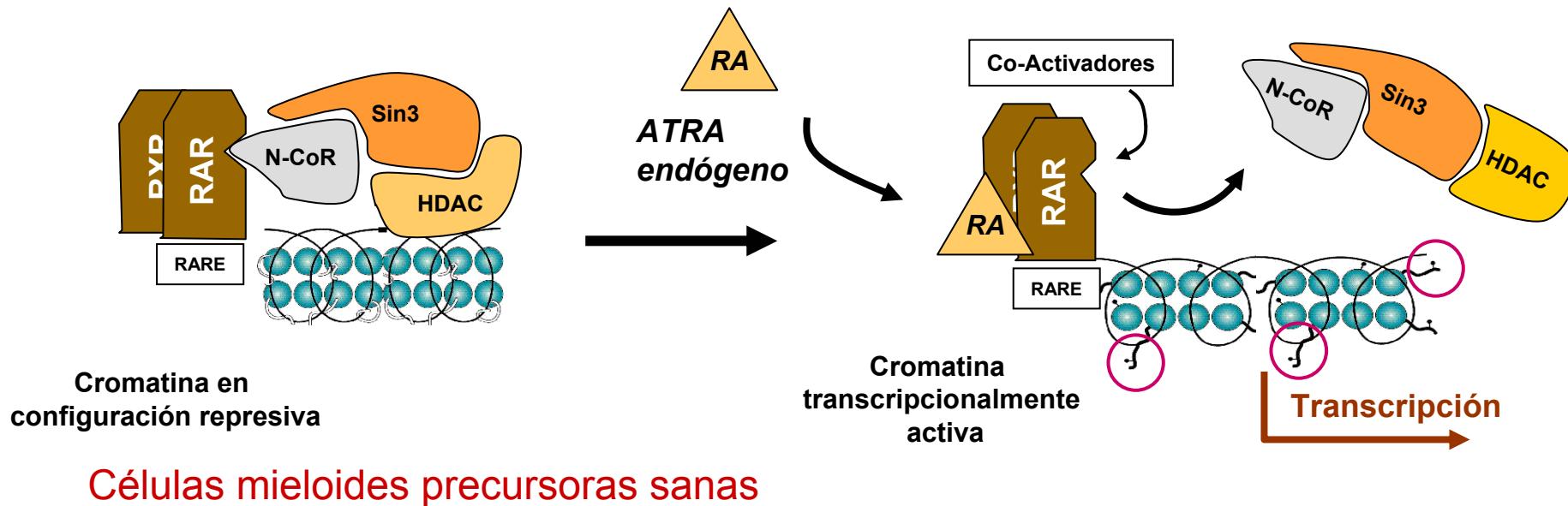
Shanghai Institute of Hematology, Shanghai Second Medical University, People's Republic of China.

Twenty-four patients with acute promyelocytic leukemia (APL) were treated with all-trans retinoic acid (45 to 100 mg/m²/day). Of these, eight cases had been either nonresponsive or resistant to previous chemotherapy; the other 16 cases were previously untreated. All patients attained complete remission without developing bone marrow hypoplasia. Bone marrow suspension cultures were studied in 15 of the 24 patients. Fourteen of these patients had morphological maturation in response to the retinoic acid (1 μmol/L). Chloroacetate esterase and alpha-naphthyl acetate esterase staining as well as electronmicroscopic examination confirmed that retinoic acid-induced cells differentiated to granulocytes with increased functional maturation (as measured by nitroblue tetrazolium reduction, NBT). The single nonresponder to retinoic acid in vitro was resistant to treatment with retinoic acid but attained complete remission after addition of low-dose cytosine arabinoside (ara-C). During the course of therapy, none of the patients showed any abnormalities in the coagulation parameters we measured, suggesting an absence of any subclinical disseminated intravascular coagulation. The only side effects consisted of mild dryness of the lips and skin, with occasional headaches and digestive symptoms. Eight patients have relapsed after 2 to 5 months of complete remission. The others remain in complete remission at 1+ to 11+ months and are still being followed up. We conclude that all-trans retinoic acid is an effective inducer for attaining complete remission in APL.

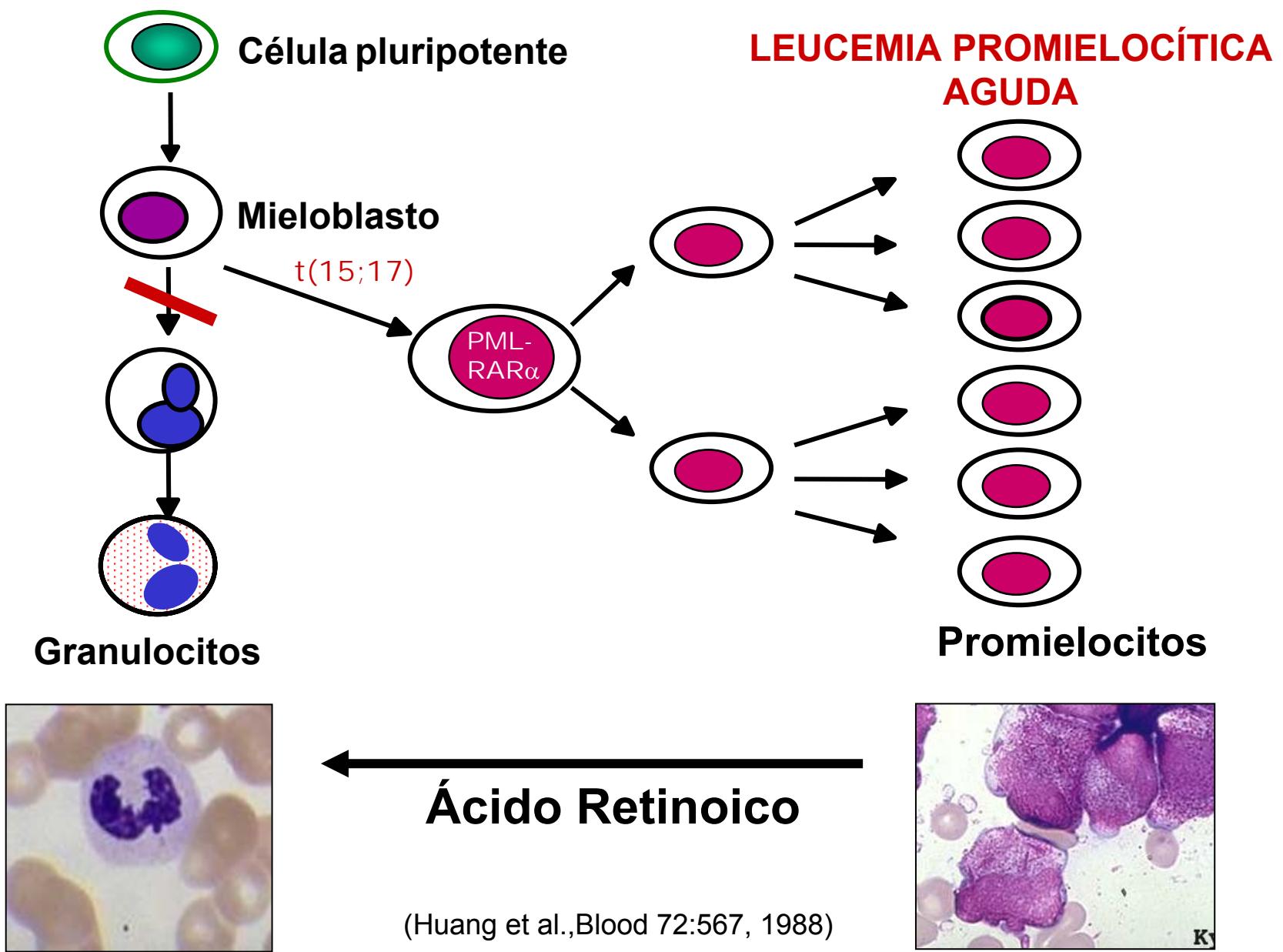
En 1960 la supervivencia de APL era 1-2 semanas tras el diagnóstico, ahora se curan el 70-90%, con una terapia basada en ATRA+ATO+antraciclinas

También con transplante de médula ósea

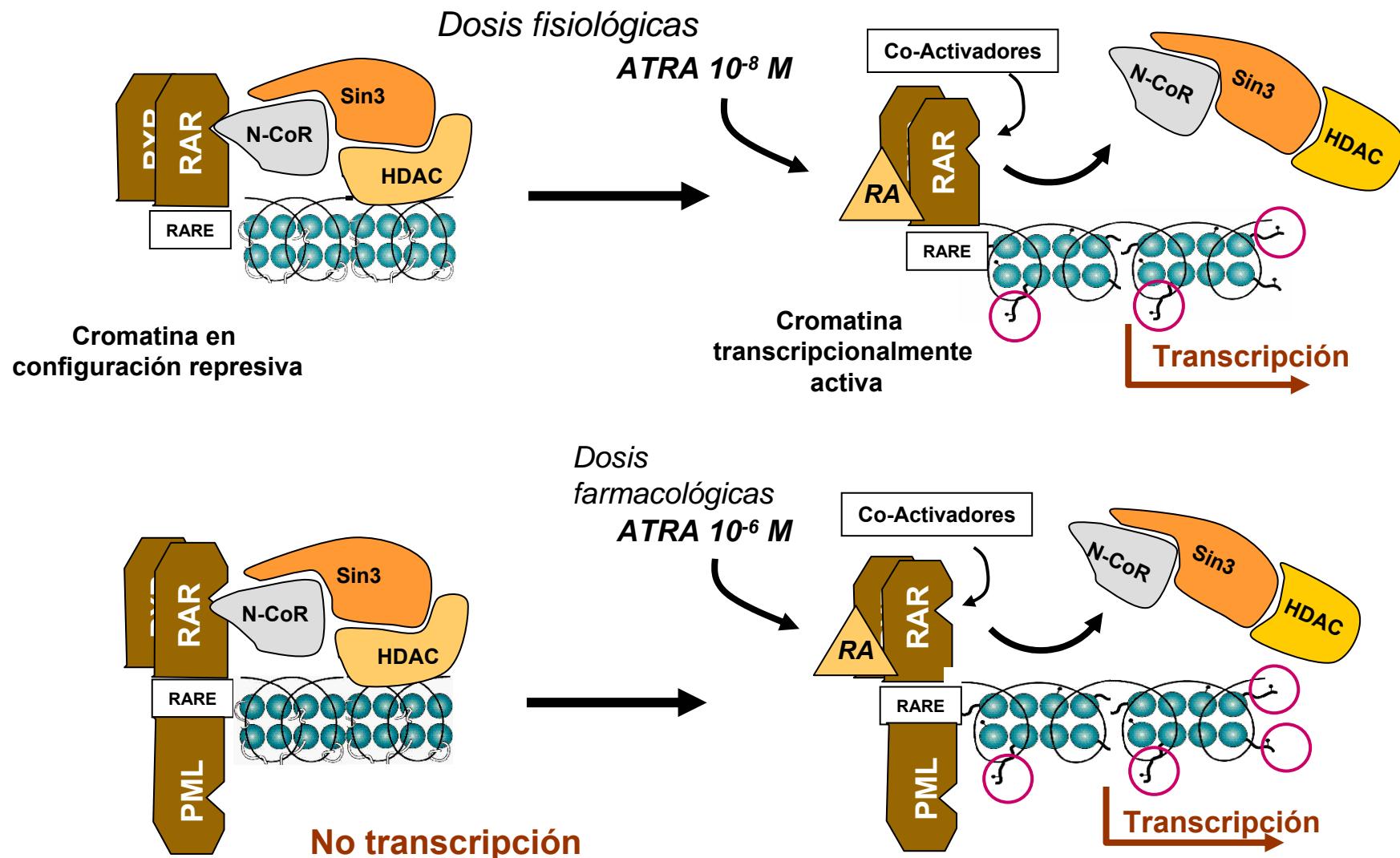
PML-RAR α no activa transcripción en respuesta a retinoico



Tratamiento diferenciador de la LPA



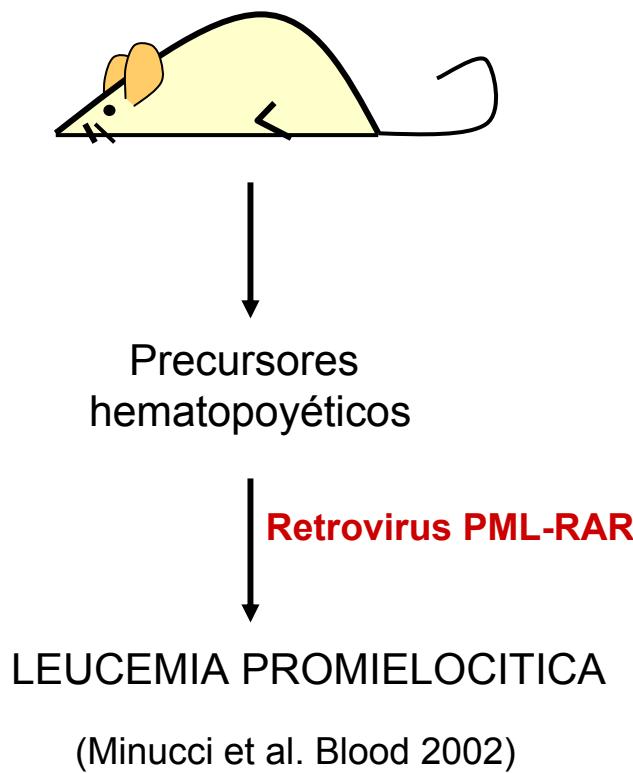
El ácido retinoico revierte la represión transcripcional del PML-RAR α



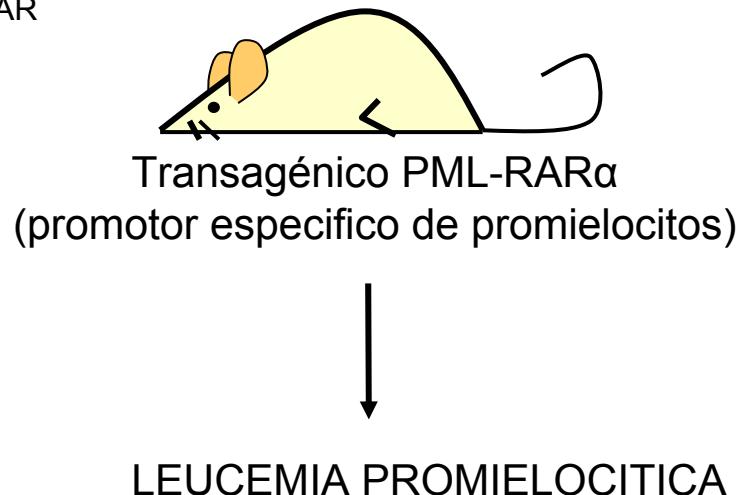
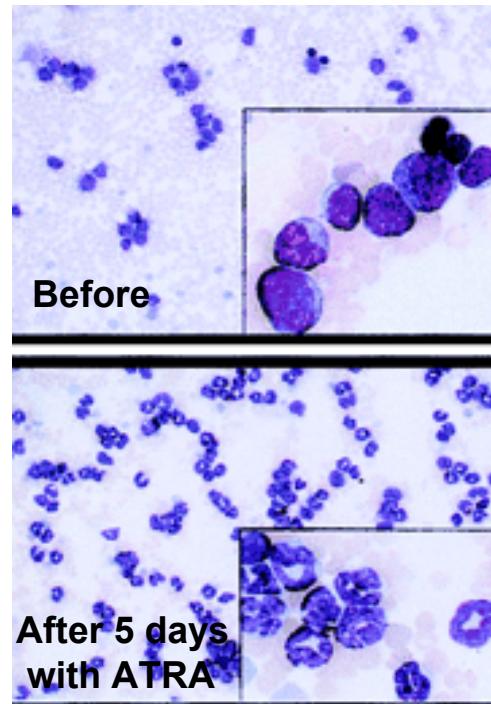
(Grignani et al., Nature 391:815, 1998)

Javier León

La expresión de PML-RAR en células de médula osea de ratones produce leucemia promielocítica



Peripheral blood smears from a PML-RAR mouse at the leukemic stage

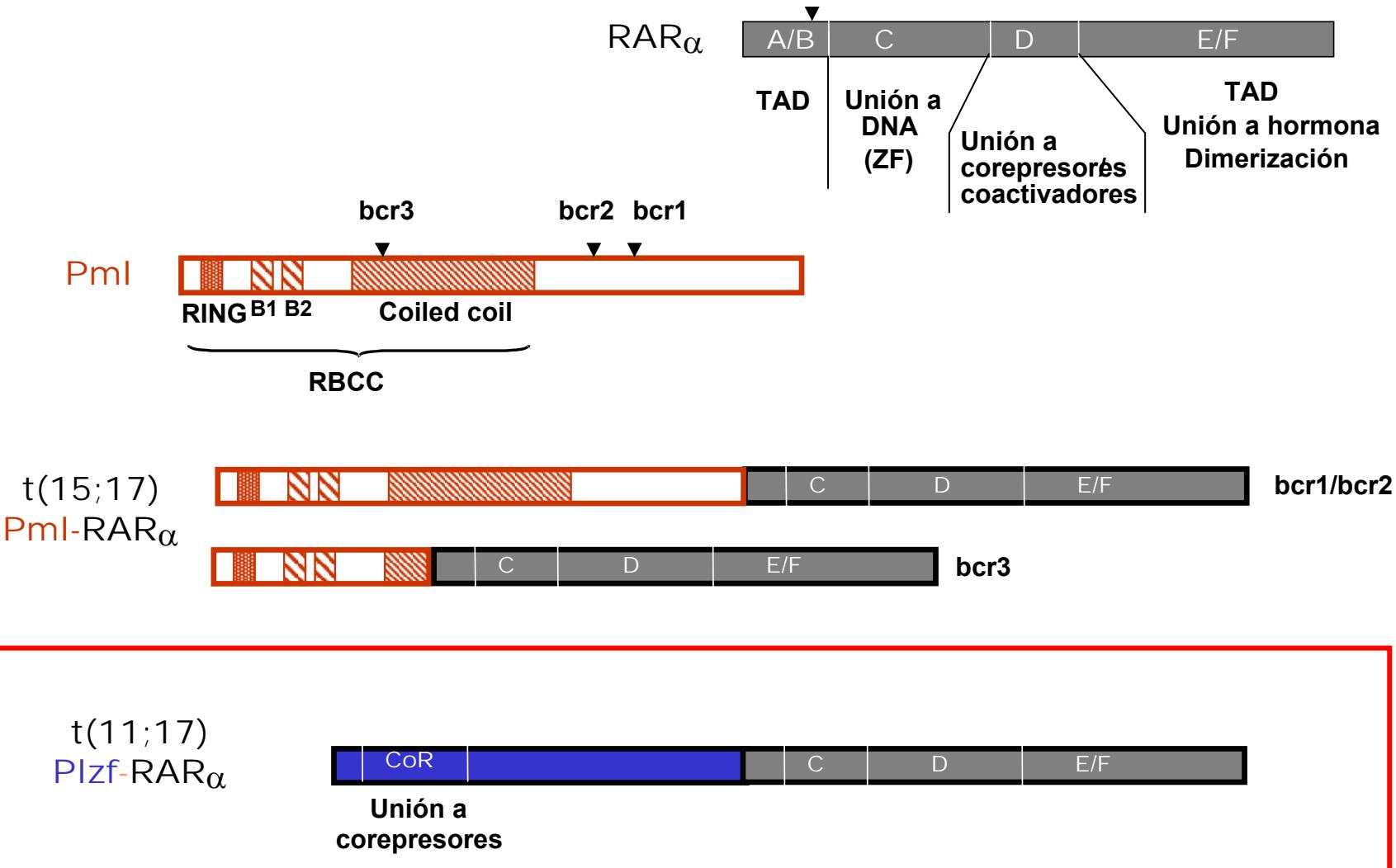


Alteraciones cromosómicas recurrentes en LMA				
FAB	Cariotipo	Genes implicados	Frecuencia	
M0	inv(3q26) t(3;3)	<i>EVI1</i>	1	15-20% del total de LMA en países mediterráneos, un 10% en anglosajones
M2	t(8;21) t(6;9)	<i>AML1-ETO</i> <i>DEK-CAN</i>	40 1	
M3	t(15;17) t(11;17)	<i>PML-RARα</i> <i>PLZF-RARα</i>	98 1	15-20% del total de LMA en países mediterráneos, un 10% en anglosajones
M4	11q23 inv(3q26)	<i>MLL</i> <i>EVI1</i>	20 3	
M4Eo	inv (16) / t(16;16)	<i>CBFβ-MYH11</i>	80	
M5	11q23	<i>MLL</i>	20	
M7	t(1;22)	?	5	

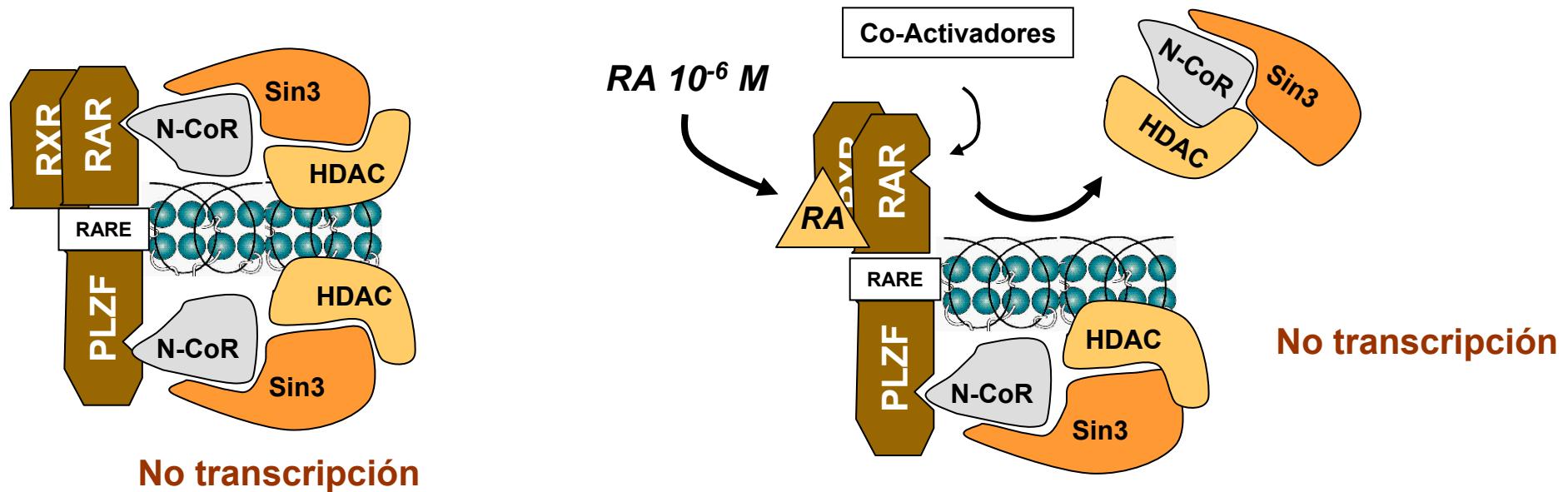
Otras tres traslocaciones muy raras identificadas:

- NPM (nucleofosmina)-RAR α NuMA (nuclear mitotic apparatus)-RAR α
- Stat5b-RAR α

La leucemia promielocítica se asocia a la expresión de PML-RAR α

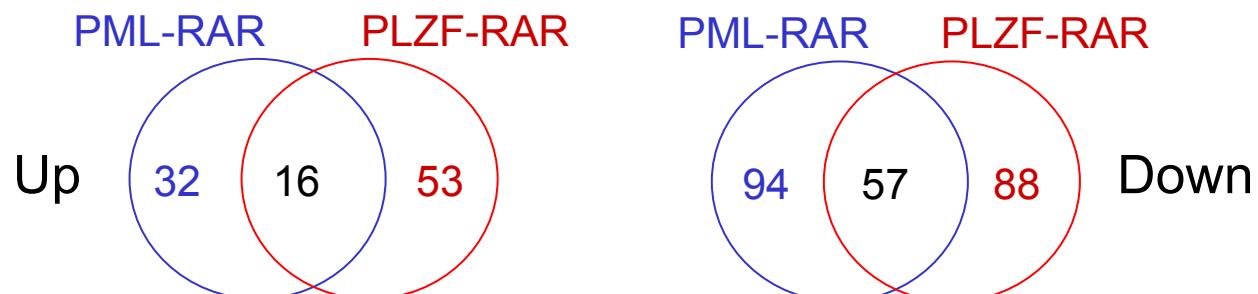


Las LPAs con PLZF-RAR α son resistentes al tratamiento con ATRA



PML-RAR y PLZF-RAR α inducen genes comunes y diferentes

En U937 sobre
5000 genes:
(Park, Blood 2003)



¿PML-RAR α funciona como dominante negativo de RAR α en las LPAs?

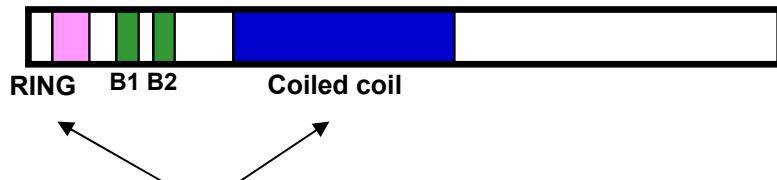
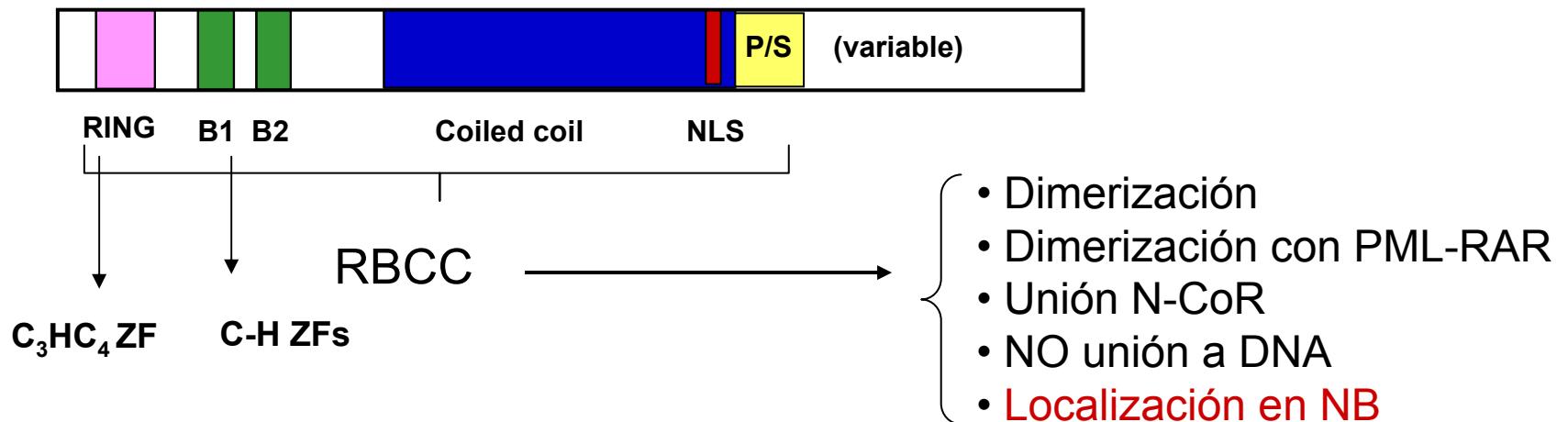
- PML-RAR α inhibe la activación transcripcional de RAR α
- PML- RAR α inhibe la diferenciación dependiente de RAR α
- La transducción de RAR α truncado en progenitores mieloides de ratón da a lugar a líneas celulares bloqueadas en estadios tempranos de la diferenciación mielocítica (promielocitos diferenciables *in vitro*)

PERO:

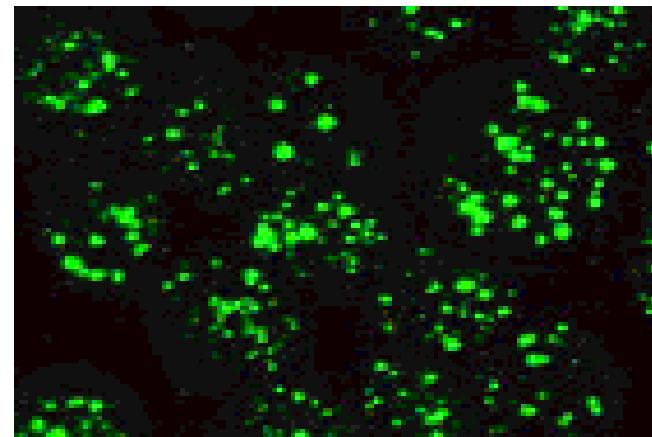
- Ratones RAR α -/- tienen granulopoyesis normal
- Las líneas celulares con RAR α truncado no son leucemogénicas
- La supresión de PML-RAR α en células derivadas de LPA induce apoptosis pero NO diferenciación
- Los ratones transgénicos con PML-RAR α (*hMRP8-PML-RAR α , catepsina G-PML-RAR α*) tienen leucemia promielocítica pero con latencias de meses → hacen falta otras alteraciones

PML

40 kb, 10 exones, 7 isoformas, 48-98 kDa

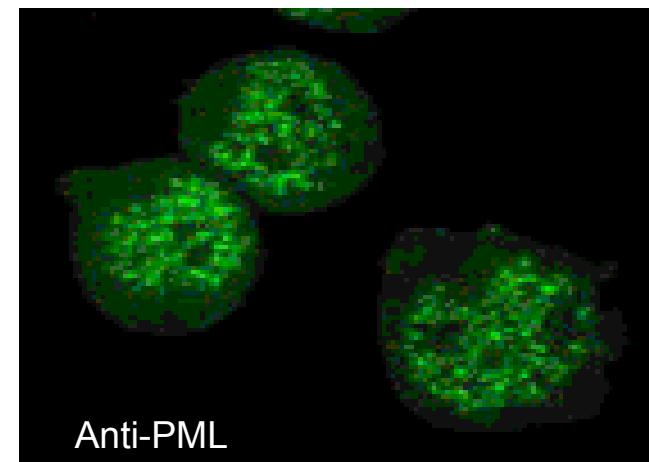
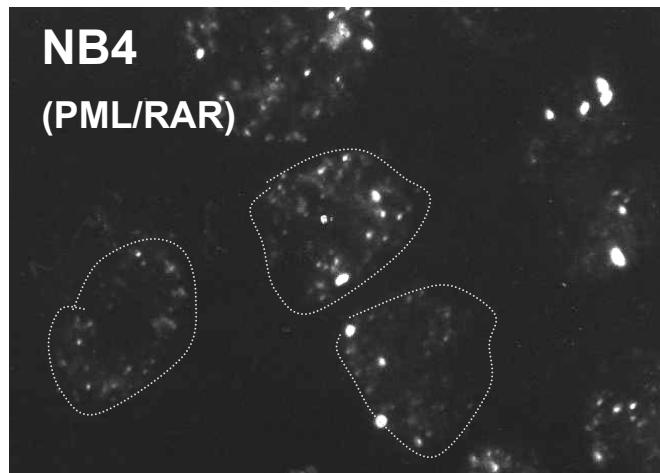
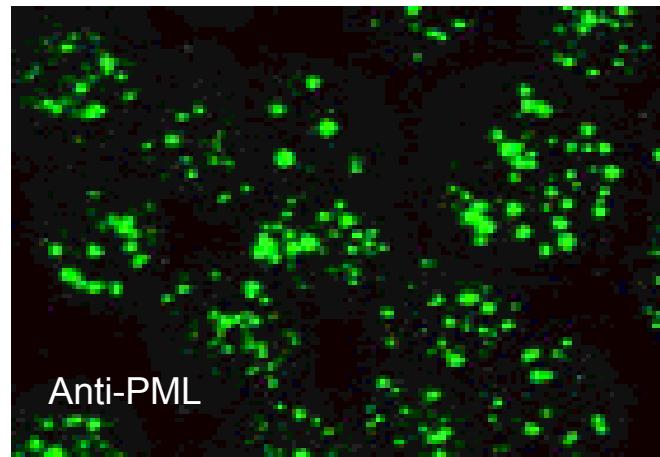
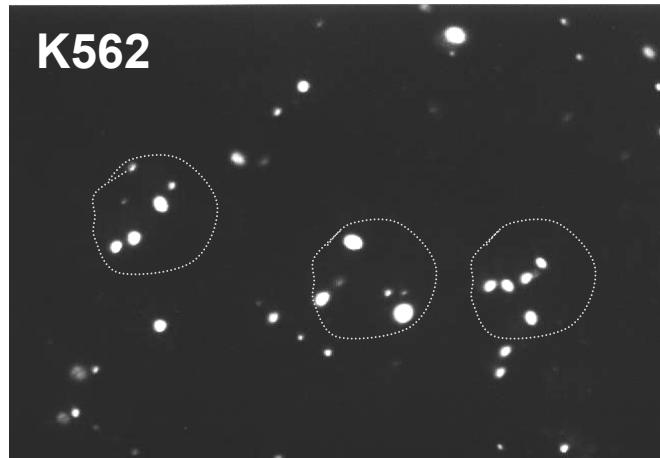


Necesarios para la localización en cuerpos nucleares



PML-nuclear bodies
Kremer bodies
POD
(PML Oncogenic Domains)

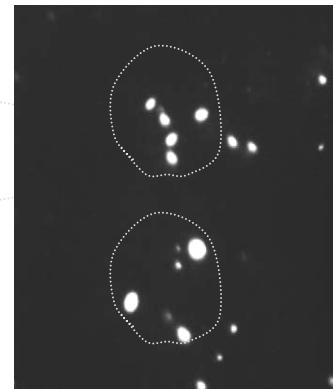
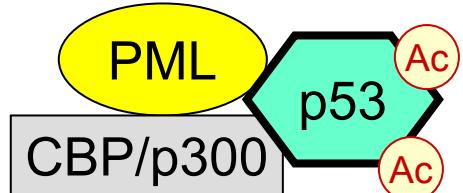
La ausencia de cuerpos nucleares-PML es un marcador de la leucemia promielocítica



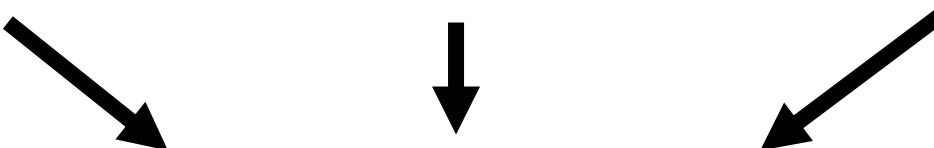
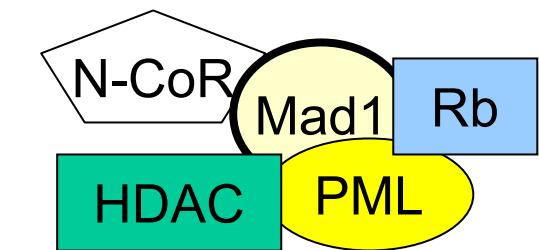
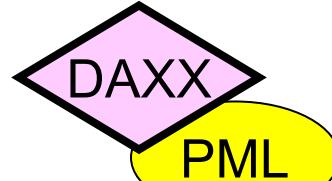
Interacciones y colocalizaciones de PML en los PML-NB

* Consistente con la ausencia de mutación en p53 en las LPA

PML-RAR α
(Minucci, Blood 2004)



PML-nuclear bodies



¿PML es un supresor de tumores?

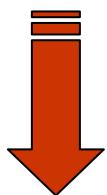
- Baja expresión en células proliferantes (epidermis, endoteliales y médula ósea), y mayor expresión en células diferenciadas quiescentes mieloides y endoteliales
- Fibroblastos y queratinocitos de ratón *pml*^{-/-} crecen más rápido y son resistentes a la apoptosis por Fas, TNF, ceramida
- La expresión forzada de PML en células en cultivo inhibe el crecimiento y/o induce apoptosis
- Ratones *pml*^{-/-} son resistentes a la apoptosis por radiación gamma y desarrollan más tumores de piel, sarcomas y leucemias en protocolos de carcinogénesis experimental
- Ratones *pml*^{-/-} muestran deficiencias en diferenciación mieloide
- **Pero no se ha descrito mutación/deleción de PML en otros tumores humanos**

PML-RAR α

PML

Factor pro-apoptótico
Supresor de tumores

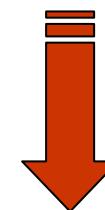
Inhibidor del crecimiento



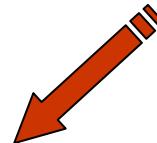
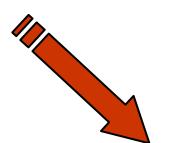
Ventaja proliferativa
Mayor supervivencia
Susceptibilidad a tumores

RAR α

Regulador de genes de
diferenciación



Bloqueo de la diferenciación
hematopoyética



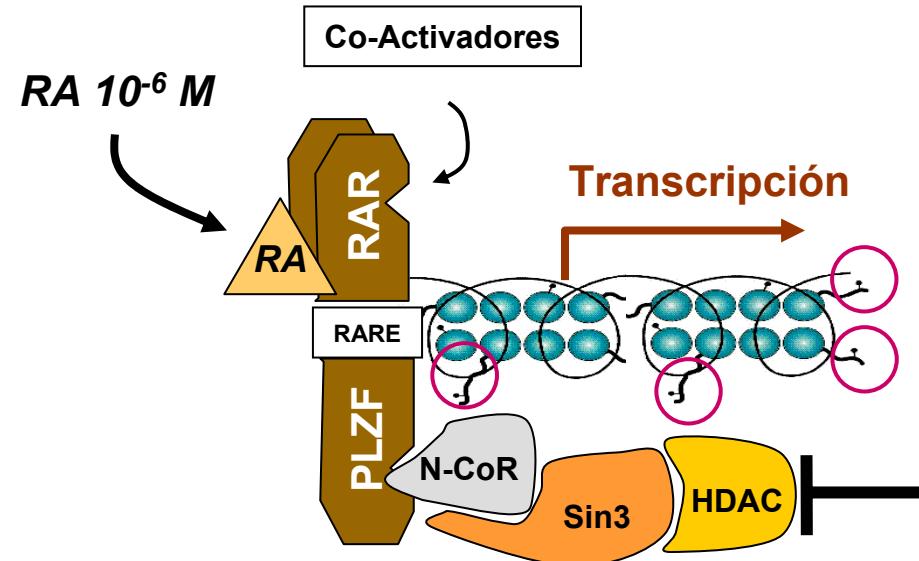
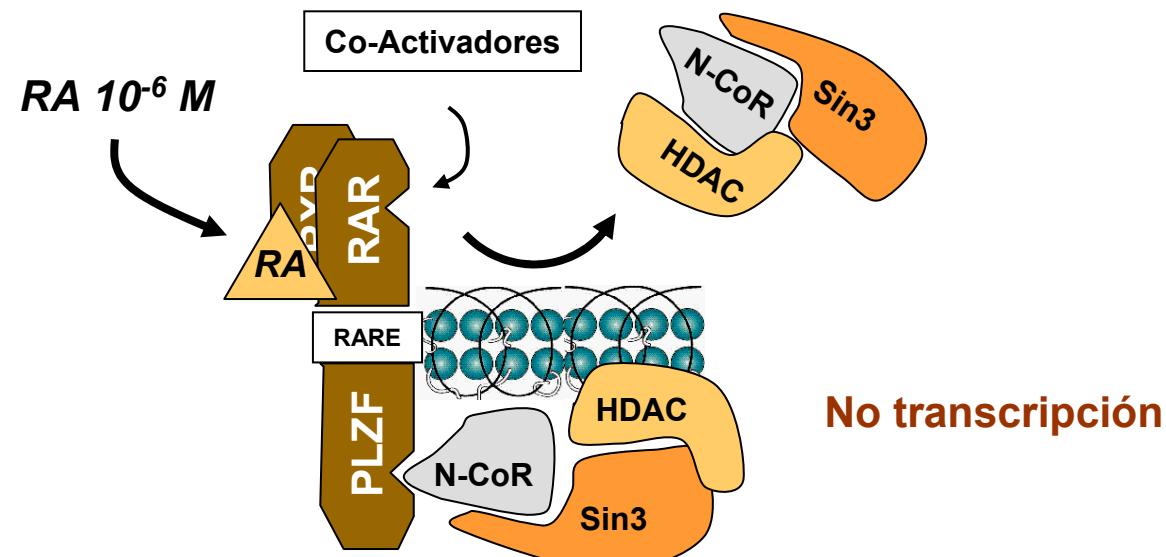
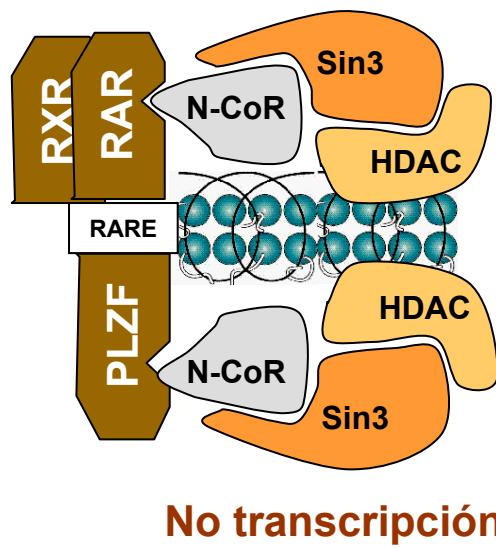
Leucemia Promielocítica Aguda

Nuevos tratamientos de LPA

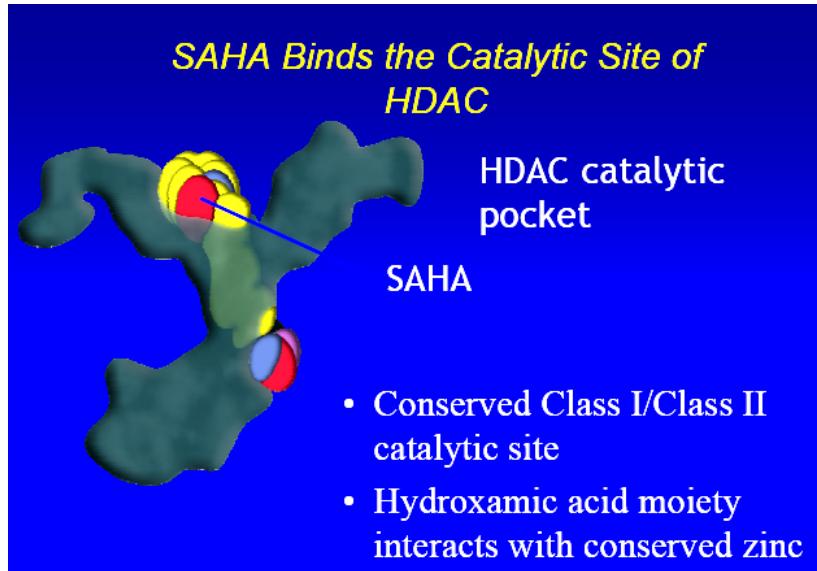
- ATRA liposomal
- 9-cic-retinoico
- AM80: 10 veces más potente que el ATRA
- Tricostatina (y otros inhibidores de histona deacetilasas)
- Trióxido de arsénico

NUEVOS RETINOIDES EN OTROS TUMORES

- CD437 : efecto citotóxico, no diferenciador. En ensayo en otras neoplasias
- 4-HPR (N-4-hidroxifenil)retinamida): idem



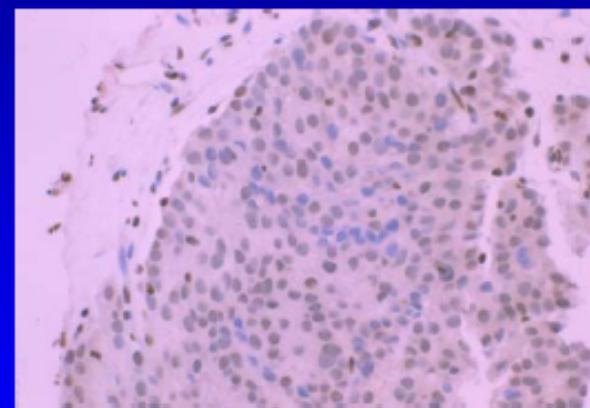
SAHA: inhibidor de HDAC ensayado en cáncer



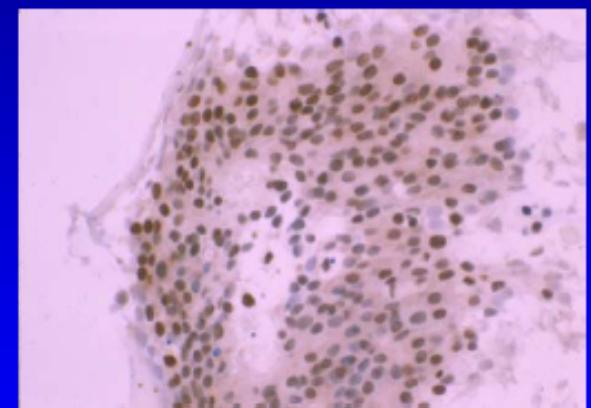
IV SAHA: Tumor Biopsy

Histone H3 Acetylation is Increased in Tumor Biopsy of Patient Treated with SAHA

PRE



POST



**PATIENT (008) - PROSTATE BIOPSIES (40X)
SAHA 900 mg/m²/day X 3 DAYS**

Anti-Acetylated Histone H3 1:2500

Nuevos tratamientos de LPA

- ATRA liposomal
- 9-cic-retinoico
- AM80: 10 veces más potente que el ATRA
- Tricostatina (y otros inhibidores de histona deacetilasas), valproico, SAHA

NUEVOS RETINOIDES EN OTROS TUMORES

- CD437 : efecto citotóxico, no diferenciador. En ensayo en otras neoplasias
- 4-HPR (N-4-hidroxifenil-retinamida): idem
- Trióxido de arsénico

El trióxido de arsénico, As₂O₃, ATO como antileucémico: bueno, bonito, barato y un poco venenoso

1970: se describe el As₂O₃ como componente activo de un remedio chino eficaz contra la LPA

Blood 1996 Aug 1;88(3):1052-61

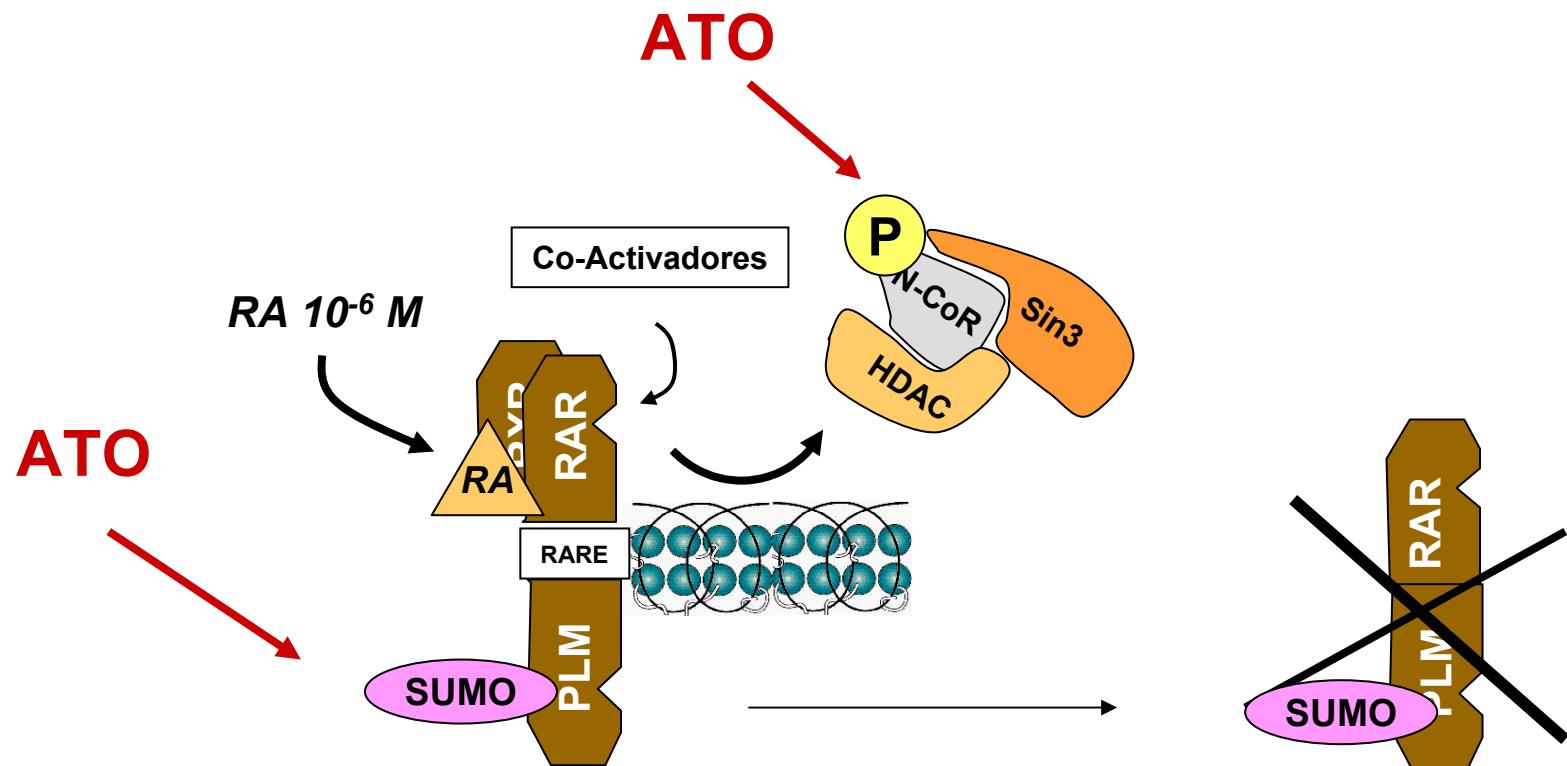
In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins.

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z.

No es activo sobre la leucemia de ratones PLZF-RAR α

MECANISMOS ANTILEUCÉMICOS DEL TRIOXIDO DE ARSENICO :

- Induce la producción de ROS (“reactive oxygen species”) → apoptosis
- Induce sumolización de PML → degradación de PML-RAR
- Induce fosforilación de NCoR y reactivación de la transcripción



Nuevos tratamientos de LPA

- ATRA liposomal
- 9-cic-retinoico
- AM80: 10 veces más potente que el ATRA
- Tricostatina (y otros inhibidores de histona deacetilasas), valproico, SAHA
- Trióxido de arsénico: introducido en terapia de LPA (NO RETINOIDE, efecto apotótico selectivo en células LPA)

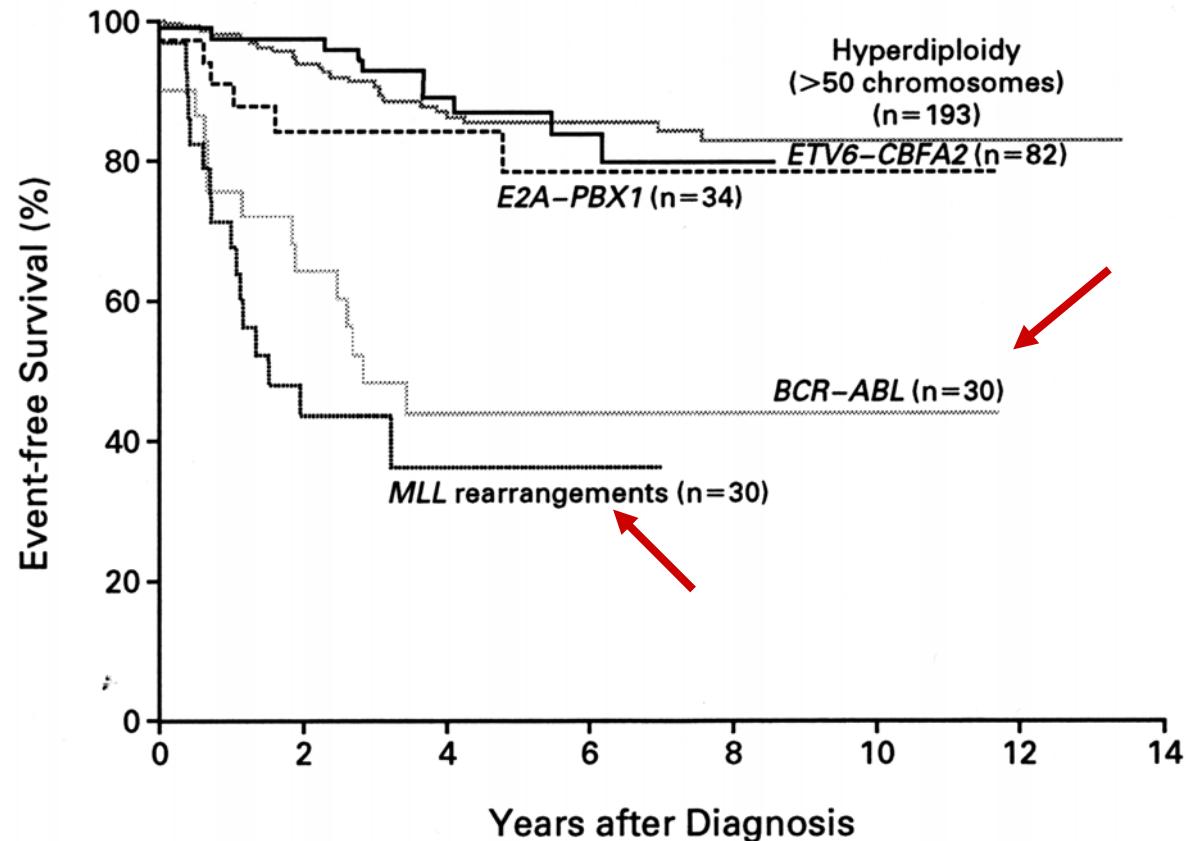
NUEVOS RETINOIDES EN OTROS TUMORES

- CD437 : efecto citotóxico, no diferenciador. En ensayo en otras neoplasias
- 4-HPR (N-4-hidroxifenil-retinamida): idem

Otras proteínas de fusión oncogénicas

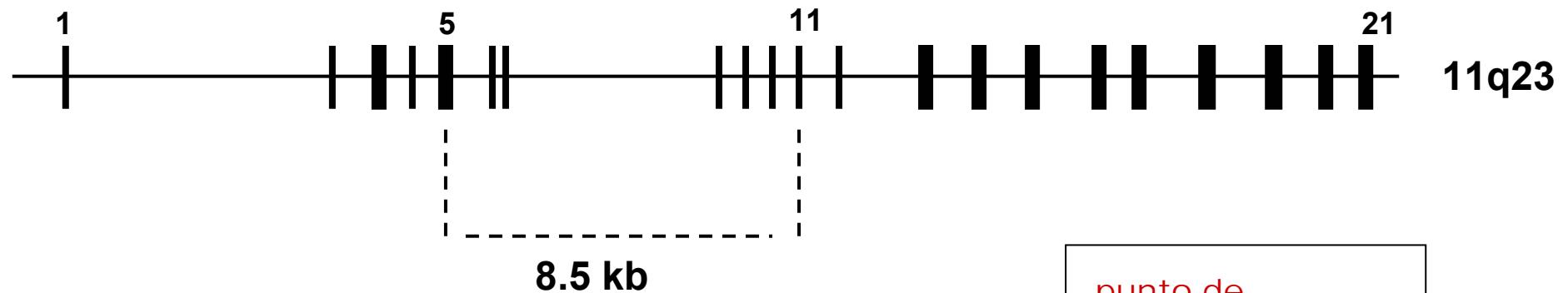
Anomalía citogenética	Dianas moleculares
t(8;21)(q22 ;q22)	<i>AML1-ETO</i>
t(15;17)(q22 ;q21)	<i>PML-RARα</i>
inv16/t(16 ;16)(p13 ;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>
t(6;11)(p25 ;q23)	<i>MLL-AF6</i>
t(9;11)(p22 ;q23)	<i>MLL-AF9</i>
t(10;11)(p12 ;q23)	<i>MLL-AF10</i>
t(11;19)(q23 ;p13)	<i>MLL-ENL</i>
t(6;9)(q23 ;q34)	<i>DEK-CAN</i>
inv3/t(3 ;3)(q21 ;q26)	<i>EVI-1</i>
t(9;22)(q24 ;q11)	<i>BCR-ABL</i>
t(3;21)(q26 ;q22)	<i>AML1-EVI1, AML1-1AP</i>
	<i>AML1-MDS1</i>

Childhood ALL: Cytogenetic Risk Groups



Pui C-H, Evans WE: NEJM, 1998

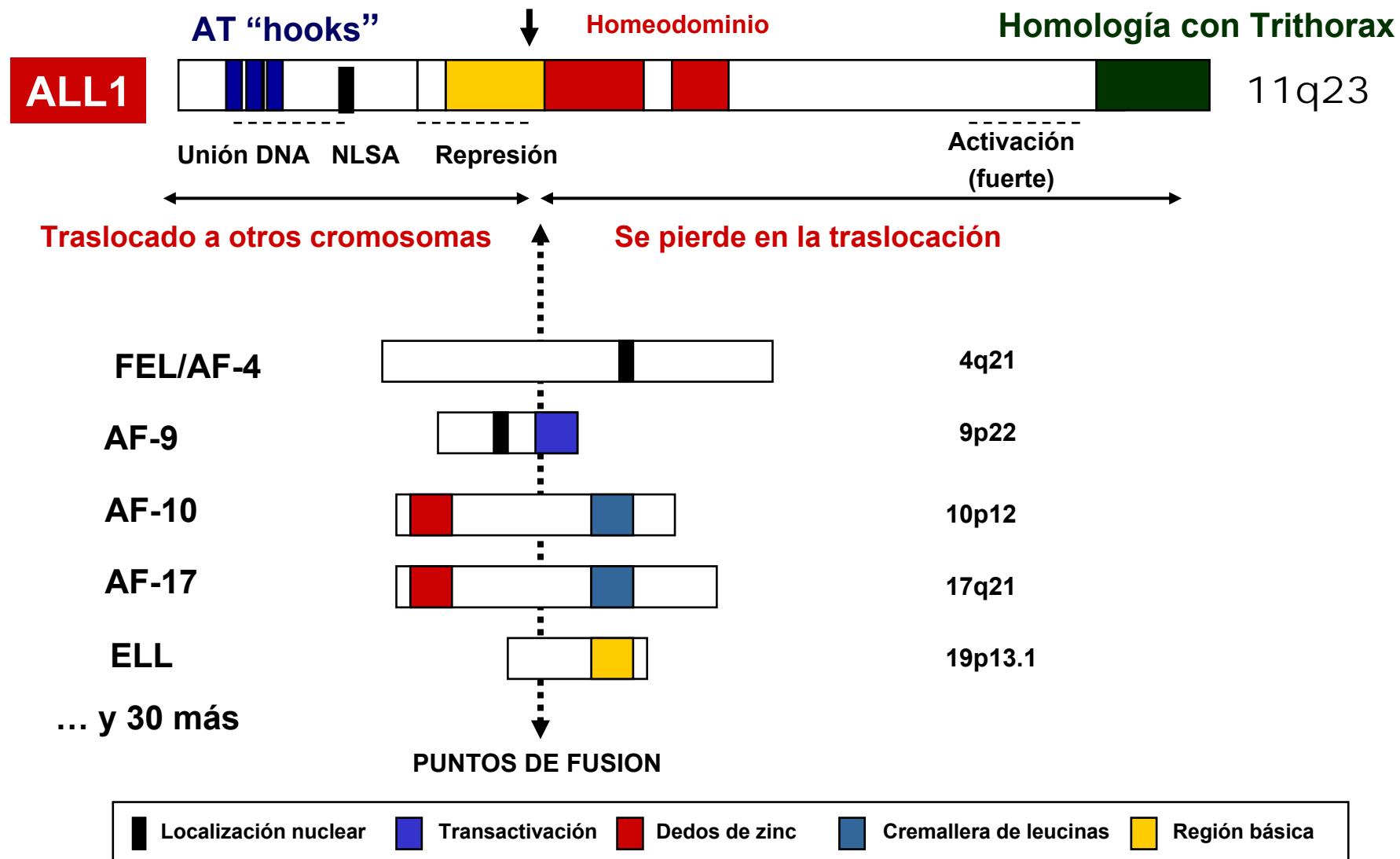
Locus genómico de ALL1



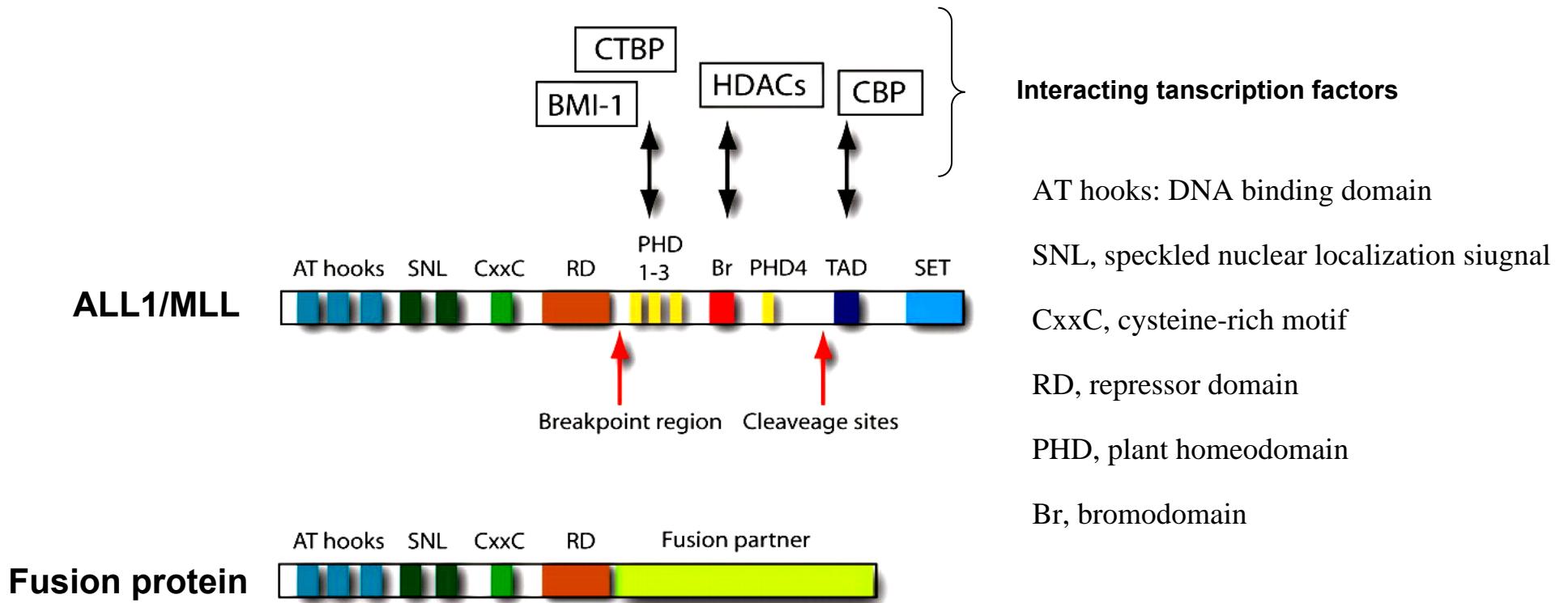
Reordenamientos del ALL1/MLL

punto de ruptura	gen
1q21	AF1Q
1p32	AF1P
4q21	FEL/AF4
6q27	AF6
9q22	AF9
10p12	AF10
16p13	CBP
19p13.3	ENL
22q13	p300

Proteínas de fusión con ALL1/MLL

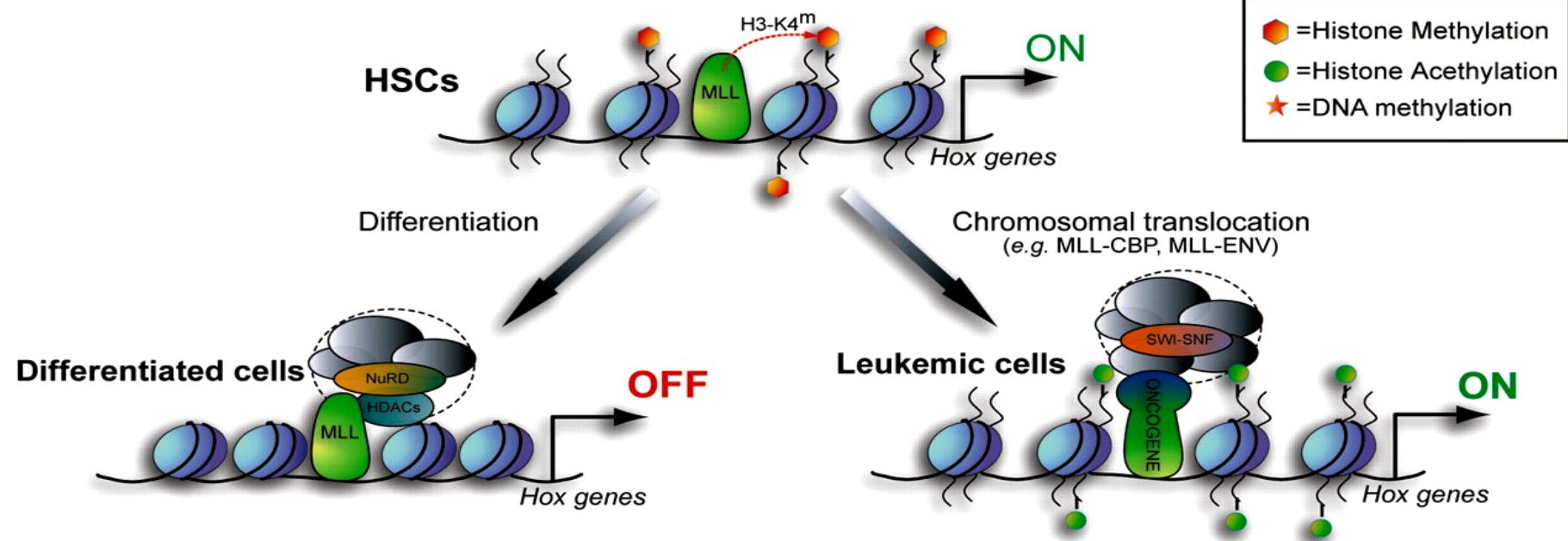


Proteinas de fusión con ALL1/MLL



(Di Croce, L. Hum. Mol. Genet. 2005 14:R77-84R)

Patogénesis molecular de las proteínas de fusión de MLL / ALL1

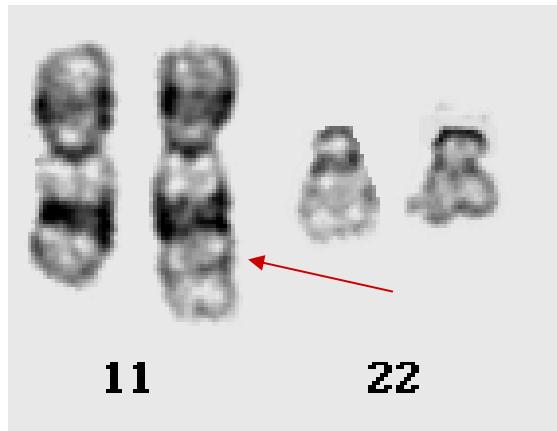


(Di Croce, L. Hum. Mol. Genet. 2005 14:R77-84R)

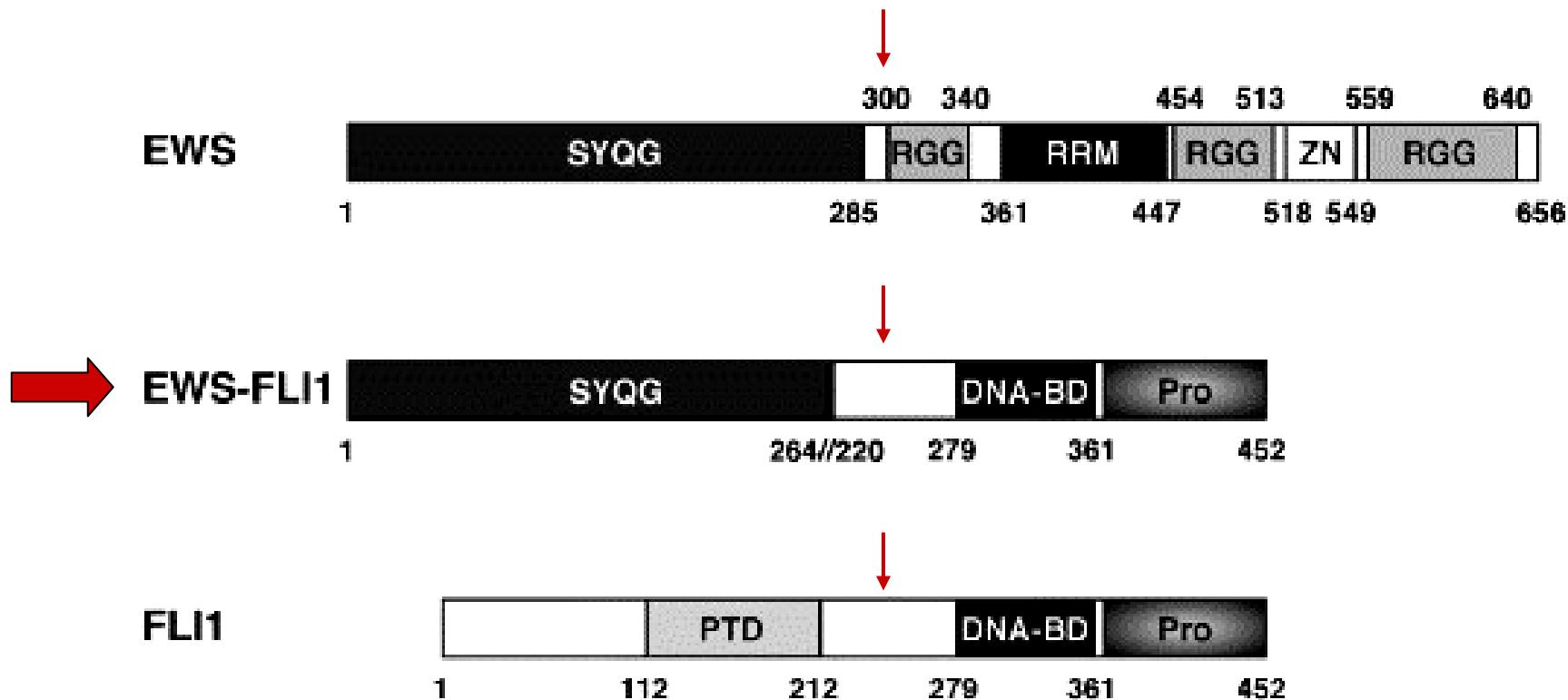
Sarcoma de Ewing



$t(11;22)$: 85 % de los casos de ES



EWS-FLI1 es la proteína de fusión más frecuente en el sarcoma de Ewing



RRM, RNA recognition motif

SYQG, serine-tyrosine-glutamine-glycine-rich, transactivation domain

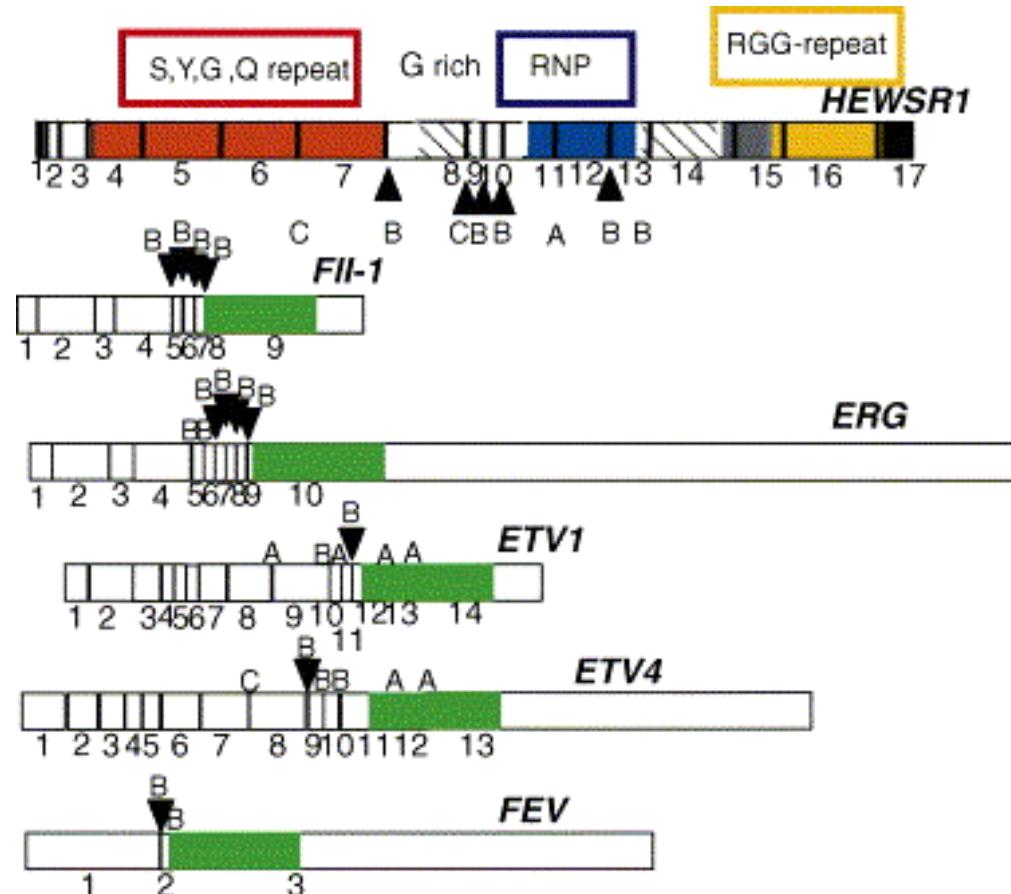
ZN, zinc finger.

Pro, proline-rich activation domain;

DNA-BD, DNA binding domain

(Janknecht, Gene 2006)

Traslocaciones que implican EWS en sarcomas de Ewing



FIN DE LA PRIMERA CLASE