



Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

**Títol del treball:**

**Proteïnes que de forma natural maten selectivament  
cèl·lules tumorals**

---

**Estudiant:** Mireia Obiols Hurtado

**Grau** en Biotecnologia

**Correu electrònic:** mire\_obiols@hotmail.com

**Tutor:** Maria Vilanova Bruges

**Empresa / Institució:** Universitat de Girona

**Vistiplau tutor:**

**Nom del tutor:** Maria Vilanova Bruges

**Empresa / Institució:** Universitat de Girona

**Correu electrònic:** maria.vilanova@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 24 de Maig de 2018

## AGRAÏMENTS

Primer de tot, m'agradaria agrair a la meva tutora, la Dra Maria Vilanova Bruges, ja que sense la seva ajuda no hauria pogut ser possible la realització d'aquest treball. Agraeixo la seva paciència, temps i dedicació al llarg del treball.

També vull agrair a la meva família, per haver-me donat ànims i suport durant tota la realització del treball, especialment a la meva mare per haver estat sempre al meu costat confiant en mi.

Finalment, als meus amics per haver estat al meu costat en els moments més difícils i ajudant-me a desconnectar quan més ho necessitava. Vull mencionar en especial a la meva amiga, Samira Arrahaoui, que, tot i trobar-se en la mateixa situació que jo, ha viscut la realització d'aquest treball al meu costat des del principi i m'ha brindat el seu suport i ajuda sempre que ho he necessitat.

## ÍNDEX

<b>1. RESUM.....</b>	<b>4</b>
1.1. RESUMEN .....	5
1.2. SUMMARY .....	6
<b>2. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>7</b>
<b>3. OBJECTIVES .....</b>	<b>8</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>9</b>
<b>5. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>10</b>
5.1. Proteïnes que de forma natural maten les cèl·lules tumorals.....	10
5.1.1. Proteïnes virals .....	11
5.1.1.1. Apoptina derivada del virus de l'anèmia del pollastre (CAV).....	11
5.1.1.2. E4orf4.....	14
5.1.1.3. NS1 derivada de parvovirus-H1 .....	17
5.1.2. Proteïnes cel·lulars .....	19
5.1.2.1. MDA-7 .....	19
5.1.2.2. TRAIL.....	21
5.1.3. Comparació de les diferents proteïnes .....	24
5.2. HAMLET.....	25
5.2.1. Descobriment i estructura .....	25
5.2.2. Mecanismes d'acció.....	26
5.2.3. Efectes terapèutics .....	29
5.3. Ètica i sostenibilitat.....	30
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>31</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>32</b>

## 1. RESUM

Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per una desregulació de la seva proliferació lligada a una inhibició de l'apoptosi que els hi permet sobreviure i ser resistents a diferents tipus de teràpies. Les teràpies convencionals com la quimioteràpia, activen la inducció de l'apoptosi però hi ha cèl·lules tumorals que poden evadir aquest mecanisme de mort i, per tant, ser resistents al tractament. En els últims anys, s'està estudiant un grup de proteïnes que maten selectivament les cèl·lules tumorals sense provocar efectes secundaris tòxics als teixits sans, augmentant així l'esperança de poder millorar en un futur pròxim la teràpia contra càncers i especialment els resistents a les teràpies convencionals. Aquestes proteïnes interactuen amb les vies de senyalització cel·lular, redirigint els processos alterats de supervivència i provoquen la mort de les cèl·lules transformades per mecanismes com apoptosi, autofàgia o catàstrofe mitòtica.

Les proteïnes que maten específicament les cèl·lules tumorals deixant intactes a les cèl·lules normals poden tenir dos orígens diferents, viral o cel·lular. Hi ha virus que codifiquen per proteïnes que poden matar les cèl·lules tumorals infectades per múltiples mecanismes, ja que aquestes són més vulnerables a la infecció per virus, explicant així el seu procés selectiu. Dins de les proteïnes virals, destaquen l'apoptina derivada del virus de l'anèmia de pollastre, E4orf4 d'adenovirus i la proteïna NS1 de parvovirus H1. Pel que fa a les proteïnes cel·lulars, s'ha identificat que la proteïna codificada pel gen associat a la diferenciació del melanoma 7 (MDA-7), el lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el factor de necrosi tumoral (TRAIL) i l' $\alpha$ -lactalbúmina letal per a les cèl·lules tumorals (HAMLET) present en la llet humana també presenten potencial terapèutic contra el càncer. Els estudis que s'estan duent a terme van dirigits a conèixer els senyals específics de mort cel·lular que indueixen cadascuna de les proteïnes esmentades així com els seus mecanismes d'acció, els quals actualment encara són força desconeguts. Algunes d'aquestes proteïnes, com MDA-7, TRAIL i HAMLET actualment es troben en les fases I i II d'assajos clínics i presentant resultats prometedors.

## 1.1. RESUMEN

Las células tumorales se caracterizan por una desregulación de su proliferación ligada a una inhibición de la apoptosis que les ha permitido sobrevivir y ser resistentes a diferentes tipos de terapias. Las terapias convencionales como la quimioterapia, activan la inducción de la apoptosis pero hay células tumorales que pueden evadir este mecanismo de muerte y, por lo tanto, ser resistentes al tratamiento. En los últimos años, se está estudiando un grupo de proteínas que matan selectivamente las células tumorales sin provocar efectos secundarios tóxicos a los tejidos sanos, aumentando así la esperanza de poder mejorar en un futuro próximo la terapia contra cánceres y especialmente los resistentes a las terapias convencionales. Estas proteínas interactúan con las vías de señalización celular, redirigiendo los procesos alterados de supervivencia y provocan la muerte de las células transformadas por mecanismos como apoptosis, autofagia o catástrofe mitótica.

Las proteínas que matan específicamente las células tumorales dejando intactas a las células normales pueden tener dos orígenes diferentes, viral o celular. Hay virus que codifican por proteínas que pueden matar las células tumorales infectadas por múltiples mecanismos, ya que estas son más vulnerables a la infección por virus, explicando así su proceso selectivo. Dentro de las proteínas virales destacan la apoptina derivada del virus de la anemia de pollo, E4orf4 de adenovirus i la proteína NS1 de parvovirus H1. En el caso de las proteínas celulares, se ha identificado que la proteína codificada por el gen asociado a la diferenciación del melanoma 7 (MDA-7), el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) i la  $\alpha$ -lactalbúmina letal para las células tumorales (HAMLET) presente en la leche humana también presentan potencial terapéutico contra el cáncer. Los estudios que se están llevando a cabo van dirigidos a conocer las señales específicas de muerte celular que inducen cada una de las proteínas nombradas, así como sus mecanismos de acción, los cuáles actualmente aún son bastante desconocidos. Algunas de estas proteínas, como MDA-7, TRAIL y HAMLET, actualmente se encuentran en las fases I y II de ensayos clínicos y presentando resultados prometedores.

## 1.2. SUMMARY

Tumour cells are characterized by deregulated apoptotic signalling, which causes uncontrolled proliferation and allows malignant cells to survive and be resistant to therapy. Conventional therapies such as chemotherapy, activate the induction of apoptosis, but there are tumour cells that evade this mechanism of death and, therefore, are resistant to treatment. In last years, the use of proteins that selectively kill cancer cells without causing toxic side effects to healthy tissues are being developed, thus increasing the hope of being able to improve in a near future new therapies against different types of cancer mainly those that are resistant to conventional therapies. These proteins interact with cell signalling pathways, redirecting the altered processes of survival and causing the death of transformed cells by mechanisms such as apoptosis, autophagy or mitotic catastrophe.

The proteins that specifically kill tumour cells leaving unharmed the normal cells, can have two different origins, viral or cellular. There are viruses that code for proteins that can kill infected tumour cells by multiple mechanisms, taking the advantages that these cells are more vulnerable to virus infection and explaining their selective process. Among the viral proteins we find the chicken anemia virus-derived protein apoptin, adenovirus-derived protein E4orf4 and the parvovirus H1 NS1 protein. Regarding cellular proteins, it has been identified that the melanoma differentiation-associated gene-7 (MDA-7), the tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and the human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumour cells (HAMLET) present in human milk, also present therapeutic potential against cancer. The studies that at present are being carried out are aimed at knowing the specific signals of cell death that induce each one of these proteins as well as their mechanisms of action, which at present are not well known. Some of them, such MDA-7, TRAIL and HAMLET, are currently in phases I and II of clinical trials and show promising results.

## 2. INTRODUCCIÓ

El càncer és una de les majors causes de mort en tot el món. Es tracta d'un trastorn que resulta de l'acumulació d'anomalies genètiques i epigenètiques, que comporta que les cèl·lules normals es transformin en malignes (Pavet, Portal, Moulin, Herbrecht, & Gronemeyer, 2011). Hi ha una pèrdua de l'equilibri entre la divisió cel·lular i la mort cel·lular, fent que cèl·lules que haurien de morir no ho facin. Una de les causes d'aquest desequilibri es pot trobar en l'apoptosi, tant en la seva disminució com en la resistència a aquesta. El mecanisme de l'apoptosi implica moltes vies i els defectes es poden donar en qualsevol punt d'aquestes (Wong, 2011). La mort cel·lular programada es tracta d'un procés regulat per l'equilibri entre les proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques (Hu & Kavanagh, 2003).

Un dels problemes dels tractaments antitumorals actuals és l'elevada toxicitat i la inducció d'efectes secundaris greus com a conseqüència del dany que provoquen a les cèl·lules normals (Pavet et al., 2011). A més, la quimioteràpia només té èxit en un nombre limitat de càncers (Maddika et al., 2006).

S'han identificat unes proteïnes amb una citotoxicitat específica per a cèl·lules tumorals, que és independent del tipus de tumor o dels canvis genètics, i això els hi confereix potencial com a noves teràpies específiques de tumors i obre una porta per a la millora del tractament dels càncers que han esdevingut resistents a fàrmacs. Aquestes proteïnes són derivades de virus humans i animals o també d'origen cel·lular (Argiris, Panethymitaki, & Tavassoli, 2011). La majoria indueixen l'apoptosi en les cèl·lules tumorals a partir de la modulació de l'activitat de les proteïnes Bcl-2 o inhibint els reguladors negatius de les caspases (proteases que intervenen en la resposta apoptòtica) (Barras & Widmann, 2011).

En el seu article, Noteborn (2009) menciona algunes de les proteïnes que indueixen l'apoptosi selectivament en cèl·lules tumorals que es coneixen actualment. Aquestes són proteïnes virals com per exemple la proteïna inductora d'apoptosi (apoptina) derivada del virus de l'anèmia de pollastre (CAV), E4orf4 present en adenovirus i la proteïna no estructural 1 derivada de parvovirus-H1 (NS1); i proteïnes cel·lulars com per exemple l'alfa-lactalbúmina humana letal per a les cèl·lules tumorals (HAMLET) present en la llet humana, citoquines humanes tals com la codificada pel gen-7 associat a diferenciació de melanoma (mda-7) o també anomenada interleucina-24 i el lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el factor de necrosi tumoral (TRAIL).

Aquests tractaments es poden administrar sols o combinats amb altres com la quimioteràpia i/o la radioteràpia. Molts es troben en etapes preclíniques però d'altres ja estan en fase d'assajos clínics (Wong, 2011). En la teràpia combinada, un tractament sensibilitzaria les cèl·lules i superaria la inhibició de la mort cel·lular mentre que aquestes proteïnes s'utilitzarien per administrar el cop específic i mortal al tumor (Grimm & Noteborn, 2010).

### 3. OBJECTIVES

The main objective of this bibliographic research project is to review the state-of-the-art on the therapeutic treatment against cancer that has been developing some years ago, related to the administration of drugs of proteic nature that naturally kill tumour cells without causing any detrimental effect in normal cells. The results obtained so far show that they present a good potential as future therapeutics agents.

In order to develop this objective, the work has been divided into two parts. In the first one, an investigation was carried out in order to know the main characteristics of these proteins and their mechanisms of action.

The second part of the project was focused on deeper study on one of these proteins named, HAMLET. In addition to its characteristics and mechanisms of action, in this project it has been carried out a study of the therapeutic approaches used to deliver this protein to tumour cells because it is currently under clinical trials.



## 4. METODOLOGIA

Atès que es tracta d'un projecte bibliogràfic, la metodologia del treball es basa en l'ús de diferents bases de dades i fonts bibliogràfiques per a la recerca d'informació sobre el tema tractat.

El buscador més utilitzat ha estat PubMed, el qual pertany al Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) i ofereix un accés gratuït a MEDLINE, la base de dades bibliogràfica principal de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) dels Estats Units, que conté més de 24 milions de referències a revistes i articles de diferents àmbits, com la biomedicina.

S'ha realitzat també una recerca a través de Google Acadèmic, on s'han trobat articles relacionats amb les proteïnes estudiades, publicats per diferents autors en diverses revistes i llibres de l'àmbit científic.

La recerca d'informació s'ha realitzat principalment en anglès, utilitzant paraules claus com *apoptin*, *ns1*, *e4orf4*, *mda7*, *trail*, *hamlet*, *oncolytic virus*, *apoptosis cancer cells*, *anticancer proteins*.

A més de l'ús de les paraules claus anteriorment esmentades, també s'ha utilitzat diferents recursos amb l'objectiu de delimitar la recerca. S'ha fet ús de les etiquetes [AND] i [OR] així com també de parèntesis.

Un dels criteris de selecció dels articles utilitzats ha estat que fossin articles de revisió recents per obtenir la informació el més actualitzada possible.

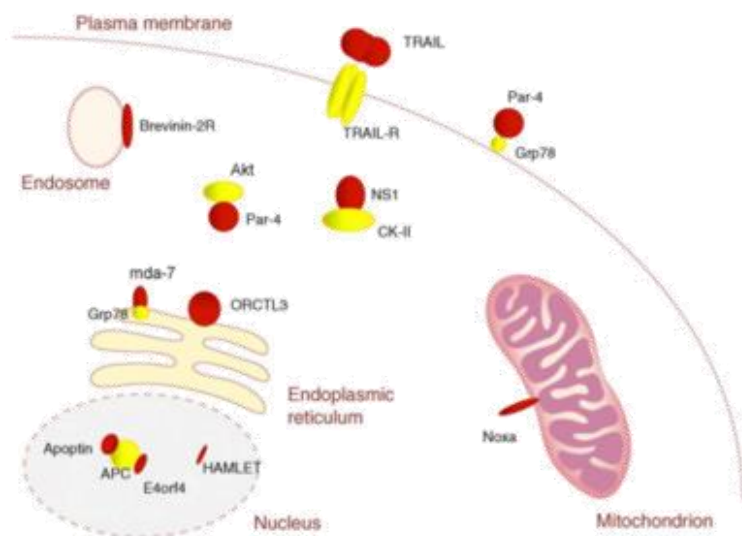
## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.1. Proteïnes que de forma natural maten les cèl·lules tumorals

Tal com s'ha descrit en la introducció, existeixen un conjunt de proteïnes que provoquen la mort selectiva de les cèl·lules tumorals. La sobreexpressió d'aquestes proteïnes provoca la destrucció de les cèl·lules tumorals per diferents mecanismes com apoptosi, necrosi o mort cel·lular autofàgica (*Grimm & Noteborn, 2010*). Aquesta sobreexpressió és citotòxica per a les cèl·lules tumorals però no afecta a les cèl·lules normals (*Pavet et al., 2011*). Un dels mecanismes d'actuació d'aquestes proteïnes seria la inhibició de les proteïnes oncogèniques i les seves vies de senyalització, que podria produir la mort cel·lular específica d'un tumor (*Grimm & Noteborn, 2010*).

Aquestes proteïnes funcionen independentment dels antecedents genètics i del tipus de cèl·lules cancerígenes (*Argiris, Panethymitaki, & Tavassoli, 2011*). Les proteïnes objecte d'aquest treball permeten identificar vies cel·lulars específiques subjacents a la formació de tumors, les quals poden ser redirigides per elles mateixes fins a la mort cel·lular (*Noteborn, 2009*).

*Grimm & Noteborn (2010)* van fer un estudi de la localització de les proteïnes que presenten propietats antitumorals de forma natural que es coneixen actualment (**Figura 1**). Aquestes proteïnes tenen una localització diferencial en la cèl·lula tumoral en comparació amb la cèl·lula normal. Es poden trobar en el nucli, disperses en el citoplasma o unides a orgànuls citoplasmàtics, com mitocondri, reticle endoplasmàtic o endosomes, o bé a la membrana cel·lular. Per exemple, HAMLET i apoptina es transloquen al nucli, fent que sigui aquest orgànul el punt on s'inicia la senyal de mort cel·lular. Per altra banda, per exemple MDA-7 sembla que causa apoptosi induïda per estrès específic del reticle endoplasmàtic, fet que podria indicar que es tracta d'un orgànul important per exercir un efecte específic de tumor. TRAIL, en canvi, inicia l'apoptosi al unir-se al seu receptor situat en la membrana cel·lular.



**Figura 1.** Representació esquemàtica de la localització cel·lular de les diferents proteïnes antitumorals conegudes en els diferents orgànuls cel·lulars, representades en vermell. En groc es mostren algunes de les proteïnes amb les quals interaccionen per dur a terme la seva funció. Akt, proteïna quinasa B; APC, complex promotor d'anafase / ciclosoma; CK-

II, caseïna quinasa II; Grp78, xaperona del reticle endoplasmàtic; TRAIL-R, receptor de membrana de TRAIL. **Font:** Grimm & Noteborn, 2010.

A continuació, es descriuen les diferents proteïnes en funció del seu origen: viral o cel·lular. Es fa una breu descripció de les més rellevants de cada tipus que es coneixen actualment parlant de les seves característiques així com també dels seus mecanismes d'actuació.

En l'apartat següent (5.2) es descriurà més en profunditat d'una de les proteïnes cel·lulars, HAMLET, la qual es troba en fases clíniques i està donant resultats positius com agent antitumoral.

### 5.1.1. Proteïnes virals

De la mateixa manera que existeixen virus que són oncogènics, és a dir, que un cop han infectat una cèl·lula la transformen en tumoral, existeixen diferents virus que de forma natural, o bé després d'ésser manipulats genèticament, poden matar de forma selectiva les cèl·lules tumorals. Aquest virus s'anomenen virus oncolítics. Per matar les cèl·lules tumorals es valen de les modificacions genètiques i epigenètiques que presenten aquestes cèl·lules que, tot i que fan que puguin créixer fora de control, també les fan més vulnerables a la infecció pels virus oncolítics ja que han perdut la capacitat d'aturar la replicació viral, la qual cosa indueix la seva mort (*Cattaneo, Miest, Shashkova, & Barry, 2008*). Els virus oncolítics tenen un tropisme positiu per a les cèl·lules tumorals que els ha convertit en una teràpia antitumoral efectiva, ja sigui administrats tot sols o en combinació amb altres fàrmacs (*Russell & Peng, 2008*). A més de les aplicacions clíniques, els virus oncolítics serveixen per identificar vies de supervivència que presenten les cèl·lules tumorals i investigar com es poden fer canviar perquè es converteixin en vies de mort cel·lular. De fet, l'estudi combinat dels canvis induïts per virus oncogènics i oncolítics ajuda a entendre què canvia en una cèl·lula quan esdevé tumoral, és a dir, perquè esdevé resistent a l'apoptosi, i d'altra banda, quines vies es poden activar per induir la mort cel·lular i com s'aconsegueix el fenomen de selectivitat (*Noteborn, 2009*).

A més dels virus oncolítics que indueixen mort cel·lular selectiva de cèl·lules tumorals, existeixen tot un conjunt de proteïnes virals que també fan una funció similar, les quals es tractaran a continuació.

#### 5.1.1.1. Apoptina derivada del virus de l'anèmia del pollastre (CAV)

El virus de l'anèmia de pollastre (CAV) és un virus de DNA monocatenari que pertany al gènere Gyrovirus. El seu genoma té 3 ORF superposats que codifiquen per un RNA missatger policistrònic que donarà lloc a tres proteïnes (*Gupta, Gandham, Sahoo, & Tiwari, 2015*):

- VP1: proteïna estructural
- VP2: proteïna amb activitat fosfatasa i implicada en l'assemblatge del viriò.
- VP3: proteïna inductora d'apoptosi (apoptina).

La proteïna VP3 està formada per 121 aminoàcids i té dues senyals de localització cel·lular (NLS1 i NLS2) a l'extrem C-terminal, les quals es troben actives tant en cèl·lules normals com tumorals. També conté una seqüència d'exportació nuclear (NES) en el mateix extrem C-terminal, únicament activa en les cèl·lules no transformades i que sembla ser crítica per l'activitat antitumoral d'aquesta proteïna (veure més avall). Aquestes seqüències són necessàries per al transport al nucli de la proteïna (*Gupta et al., 2015*). També presenta regions riques en prolina i té un extrem C-terminal amb un alt percentatge de residus de serina i treonina (*Noteborn, 2009*).

L'apoptina pot induir la mort cel·lular en un ampli rang de cèl·lules cancerígenes a través de les vies apoptòtiques clàssiques (*Pavet et al., 2011*).

### **Mecanismes d'acció**

L'apoptina es creu que té diferents mecanismes d'actuació, tot i que encara no són prou ben coneguts (**Figura 2**).

L'apoptina indueix la mort cel·lular en cèl·lules tumorals independentment de la proteïna supressora de tumors p53, requerint però l'activació de caspases (*Argiris et al., 2011*). S'ha demostrat la seva participació en la via d'apoptosi mitocondrial o intrínseca, ja que l'apoptina provoca l'alliberament de citocrom C per part de la mitocòndria i l'activació de caspasa 9 (*Los et al., 2009*).

Encara no s'ha pogut determinar la influència de l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 (proteïna 2 del limfoma de cèl·lules B) en el mecanisme d'acció de l'apoptina, ja que diferents estudis han donat resultats contradictoris. En algunes línies ha protegit a les cèl·lules de l'apoptosi induïda per apoptina mentre que en altres l'ha potenciat (*Gupta et al., 2015*). Aquestes contradiccions es poden relacionar amb la interacció de l'apoptina amb el receptor nuclear Nur77. Aquesta proteïna pot unir-se a Bcl-2, canviant la seva funció antiapoptòtica a proapoptòtica, conduint així a l'activació de la via de mort mitocondrial. Els nivells de Nur77 són diferents en les cèl·lules, fet que pot explicar els resultats oposats del paper de Bcl-2 en la mort cel·lular induïda per l'apoptina obtinguts en els estudis realitzats (*Los et al., 2009*).

La localització cel·lular de l'apoptina sembla ser important per a la inducció de l'apoptosi, ja que en les cèl·lules tumorals es troba preferentment en el nucli mentre que en les cèl·lules normals és en el citoplasma, on és inestable i molt probablement degradada (*Argiris et al., 2011*). La fosforilació de l'apoptina en la Thr-108, per diferents quinases, algunes encara desconegudes que es troben presents en les cèl·lules transformades però no en les normals, és important per a la seva retenció en el nucli, la qual sovint va lligada a la seva toxicitat o a un increment de toxicitat (*Maddika et al., 2006*).

La localització de l'apoptina al nucli cel·lular en cèl·lules tumorals s'ha descrit vinculada a l'existència en la seva seqüència de dues senyals de localització nuclear (NLS) i d'una senyal d'exportació nuclear (NES), descrites abans. En les cèl·lules tumorals, l'apoptina entra al nucli gràcies a les NLSs i queda retinguda allà perquè la senyal d'exportació nuclear queda invalidada per fosforilació del residu de Thr de la posició 108. En canvi, en cèl·lules normals no hi ha present les quinases que provoquen aquesta fosforilació, amb la qual cosa el NES és reconegut per l'exportina i l'apoptina retorna al citoplasma. Tal com s'ha dit abans, aquestes seqüències NLS i NES es troben a l'extrem C-terminal de la proteïna mentre que a l'extrem N-terminal s'hi troben seqüències riques

en Leu i Pro que són responsables de l'agregació de la proteïna i que també es creu que estan implicades en induir la mort cel·lular selectiva de cèl·lules tumorals, però no es coneix el mecanisme. És a dir, l'apoptina té dues regions implicades en la mort cel·lular, una a l'extrem N-terminal i l'altre a l'extrem C-terminal.

En el citoplasma, s'ha pogut demostrar la participació de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). L'apoptina interacciona amb la seva subunitat reguladora (p85) i provoca la fosforilació d'Akt, la qual es translocarà al nucli (*Gupta et al., 2015*). Un cop al nucli, Akt juntament amb l'apoptina activarà la quinasa dependent de ciclina 2 (CDK2) (*Argiris et al., 2011*). L'activació de CDK2 per part d'Akt pot ser causada per dos mecanismes: per fosforilació directa al seu residu Thr-39 o bé per la degradació induïda per la fosforilació del seu inhibidor p27<sup>kip1</sup> (*Los et al., 2009*). La CDK2 fosforilada promourà la fosforilació de l'apoptina en la posició Thr-108 i donarà com a resultat l'acumulació nuclear de l'apoptina. L'activació prolongada de CDK2 pot provocar alteracions en la progressió del cicle cel·lular i la mort cel·lular (*Gupta et al., 2015*).

En el nucli, s'ha demostrat la interacció de l'apoptina amb una subunitat del complex APC/C, interacció que és present en les cèl·lules tumorals però que es troba absent en les normals (*Los et al., 2009*). Mitjançant aquesta interacció, l'apoptina interfereix en la via APC/C induint així la detenció del cicle en G2/M, provocant l'apoptosi de la cèl·lula (*Grimm & Noteborn, 2010*).

A més, interactua amb una proteïna proapoptòtica, el factor associat al domini efector de mort (DEDAF), que té un paper en la regulació transcripcional. Encara no es sap, però, si aquesta interacció és responsable de la toxicitat de l'apoptina (*Los et al., 2009*).

Una altra interacció de l'apoptina és amb la proteïna de la leucèmia promielocítica (PML), tot i que diversos estudis han senyalat que sembla ser que aquesta interacció pot ser prescindible per a l'apoptosi induïda per l'apoptina (*Los et al., 2009*).

L'apoptina es pot unir al DNA nu, preferiblement a la heterocromatina, i formar superestructures. Encara no es coneix però si la unió de l'apoptina al DNA provoca efectes transcripcionals (*Los et al., 2009*).

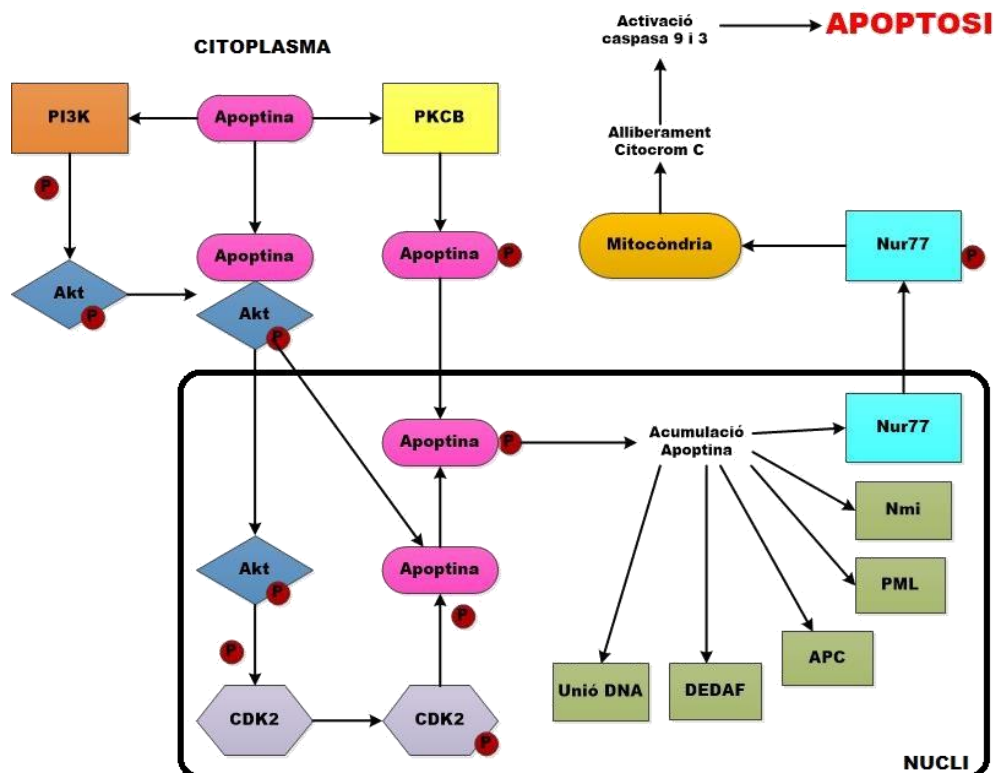
S'ha observat també l'associació de l'apoptina amb la proteïna que interactua amb N-Myc (Nmi), la qual interactua amb els factors de transcripció protooncogènics Myc. S'ha proposat que la interacció de l'apoptina amb Nmi pugui explicar l'especificitat tumoral de l'apoptina, ja que Nmi es troba en nivells baixos en les cèl·lules normals mentre que es troba altament regulada en les cèl·lules transformades. Tot i això, encara es necessiten més estudis per acabar d'explicar l'àmplia activitat antitumoral de l'apoptina (*Los et al., 2009*).

Un altre mecanisme proposat és la regulació negativa de la proteïna de xoc tèrmic de 70 kDa (Hsp70). L'apoptina competeix amb el factor de transcripció HSF1 per unir-se al promotor de Hsp70, reduint així l'expressió de Hsp70 i condueix la cèl·lula a l'apoptosi (*Gupta et al., 2015*).

Com s'ha comentat anteriorment, l'apoptina interacciona amb Nur77 i provoca la seva fosforilació en el nucli. Un cop fosforilat, Nur77 es desplaça al citoplasma i és capaç de transmetre senyals apoptòtics a les mitocòndries, que conduiran a l'apoptosi per la via de mort mitocondrial associada amb l'alliberament de citocrom C (*Gupta et al., 2015*).

Estudis recents han demostrat una altra via de fosforilació de l'apoptina, mitjançant la proteïna quinasa C (PKC), concretament la PKCB, en models de càncer de mieloma múltiple (Argiris, Panethymitaki, & Tavassoli, 2011). PKCB s'encarrega de promoure la proliferació cel·lular i la supervivència. Així doncs, aquests estudis indiquen que l'apoptina és capaç de redirigir la via de supervivència cel·lular mediada per PKCB cap a la via apoptòtica (Gupta et al., 2015).

Encara no es coneix com aquests mecanismes poden estar lligats ni com es produeix la selectivitat per a cèl·lules tumorals, més enllà del mecanisme d'inactivació del NES per fosforilació en cèl·lules tumorals.



**Figura 2.** Representació de possibles mecanismes d'acció de l'apoptina. En el citoplasma, activa la quinasa PI3 (PI3K) i provoca la fosforilació de l'Akt, la qual s'associa amb l'apoptina i es transloquen conjuntament al nucli. En el nucli, Akt fosforila CDK2, la qual fosforila l'apoptina a la Thr-108, invalidant la seqüència d'exportació nuclear (NES). Així doncs, aquesta apoptina fosforilada no pot tornar al citoplasma i s'acumula al nucli. Aquí interaccionarà amb diverses proteïnes: DEDAF, Nmi, APC/C, PML i Nur77. Nur77 es fosforila, la qual cosa li permet la sortida al citoplasma on activarà la via de mort cel·lular mitocondrial. La interacció amb APC fa que aquesta s'inactivi i que es doni una aturada en G2/M del cicle cel·lular. Hi ha altres mecanismes implicats, encara no prou ben coneguts, com la fosforilació de l'apoptina a través de la PKCB.

### 5.1.1.2. E4orf4

La proteïna d'adenovirus E4orf4 és un regulador viral multifuncional que afecta a varis processos cel·lulars (Gupta et al., 2015).

Actualment aquesta proteïna es troba en estudis preclínic. Els resultats obtinguts demostren que es produeix una inhibició del creixement tumoral (Noteborn, 2009). La seva expressió a nivells elevats indueix la mort cel·lular selectivament en cèl·lules cancerígenes independentment de la proteïna p53, fet que la converteix en una molècula

amb un gran potencial per a futures teràpies contra el càncer (*Maddika et al., 2006*). A més a més, sembla ser que és capaç d'induir vies alternatives no apoptòtiques, ja que no requereix l'alliberament de citocrom C o vies de caspasa clàssiques i tampoc s'inhibeix per Bcl-2 (*Grimm & Noteborn, 2010*). S'està estudiant la seva administració sense la infecció amb virus, ja que s'ha observat que durant la infecció els nivells de E4orf4 són baixos i no s'indueix la mort cel·lular (*Kleinberger, 2015*).

Es tracta d'una proteïna de 114 aminoàcids amb dos regions d'aminoàcids diferenciades en la seva estructura (*Maddika et al., 2006*):

- Una regió rica en prolines a l'extrem N-terminal, que representa un lloc d'unió del domini SH3 (domini d'homologia al domini 3 de la proteïna Src).
- Una altra regió amb aminoàcids bàsics, que representa un motiu ric en arginines (ARM). Aquest motiu s'ha demostrat que és essencial per a la localització nuclear de la proteïna, ja que dirigeix la proteïna E4orf4 al nucli i també es troba involucrat en la seva toxicitat (*Gupta et al., 2015*).

### Mecanismes d'acció

Tot i les moltes investigacions que s'estan duent a terme per avaluar el potencial de E4orf4 com a teràpia contra el càncer, encara no són del tot clars els seus mecanismes d'acció, la seva capacitat per diferenciar entre cèl·lules tumorals i cèl·lules normals i les proteïnes que es troben implicades en aquests processos (*Gupta et al., 2015*).

La mort cel·lular induïda per E4orf4 es pot donar per vies diferents, dependent de la seva localització cel·lular, les quals es mostren en la **Figura 3**. Es suggereix que E4orf4 pot induir dues rutes de mort cel·lular diferents: una nuclear mitjançant la interacció amb la fosfoproteïna fosfatasa 2A (PP2A) i una altra citoplasmàtica a través de la interacció amb les quinases Src.

En el nucli, interactua amb PP2A, que és important en el desenvolupament tumoral (*Grimm & Noteborn, 2010*). PP2A és una serina/treonina fosfatasa formada per tres subunitats (A, B i C) amb diferents isoformes per a cada subunitat. E4orf4 s'uneix a la subunitat reguladora B $\alpha$ /B55 de PP2A, la qual és essencial per a la inducció de la mort cel·lular (*Maddika et al., 2006*). Aquesta unió permet la interacció amb altres molècules presents en el nucli.

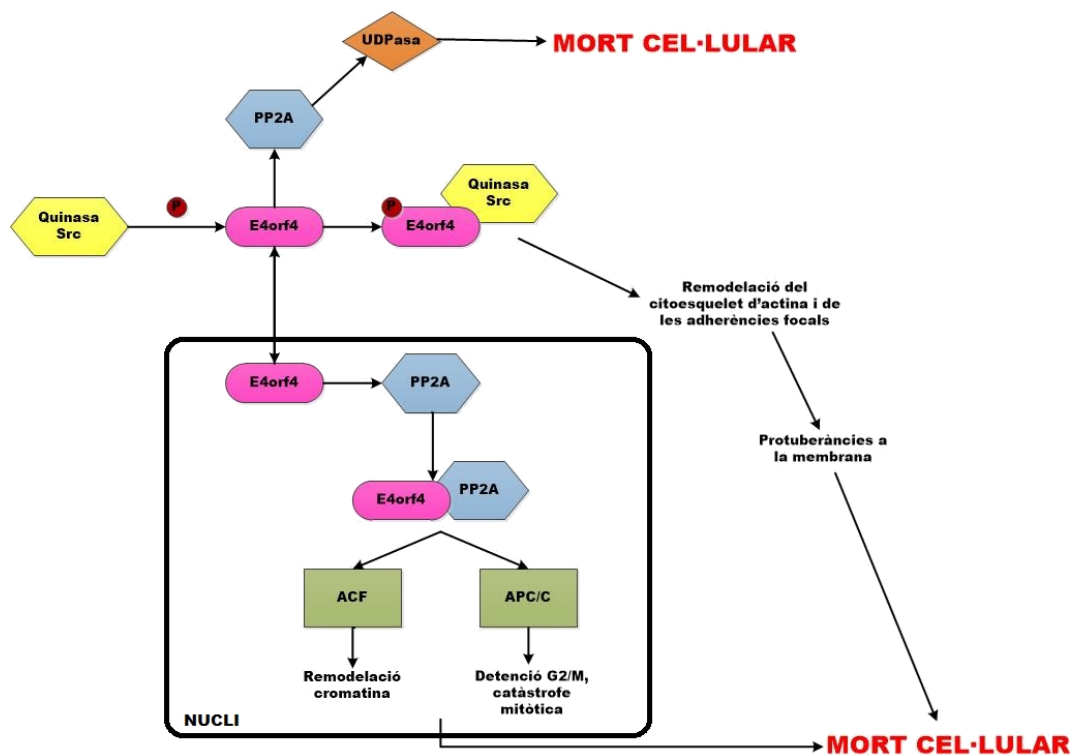
Es pot unir al factor de remodelació de la cromatina dependent d'ATP (ACF), que s'associa amb la subunitat C de la PP2A en presència de E4orf4, ja que aquest altera les propietats d'unió a cromatina de PP2A reclutant-la a ACF. E4orf4 juntament amb PP2A inhibeix ACF, fet que condueix a un canvi en l'equilibri entre diversos complexos de remodelació. La variació en l'activitat de remodelació de la cromatina altera l'estructura de la cromatina i indueix canvis en la transcripció, replicació del DNA, reparació del DNA i altres processos que requereixen una remodelació. Aquests fets condueixen a la mort cel·lular quan E4orf4 s'expressa sol (*Kleinberger, 2015*).

A més, també interactua amb APC/C, complex que es requereix per a la transició de metafase a anafase durant el cicle cel·lular. Aquesta interacció indueix la detenció del cicle cel·lular en G2/M (*Maddika et al., 2006*) i acaba desencadenant en una catàstrofe mitòtica i, finalment, en la mort cel·lular molt sovint per apoptosi (*Gupta et al., 2015*). La catàstrofe mitòtica és un mecanisme oncosupressor que impedeix la proliferació i/o

supervivència de les cèl·lules que no poden completar la mitosi degut a un dany en el DNA, problemes amb la maquinària mitòtica i/o error dels punts de control mitòtic. Es caracteritza per canvis nuclears com multinucleació i macronucleació, a causa de la mala segregació cromosòmica, i micronucleació, com a resultat de la persistència de cromosomes retardats o excèntrics (Galluzzi et al., 2018).

L'acumulació de E4orf4 en el citoplasma depèn de la seva interacció amb les quinases de la família Src, mediada per el domini quinasa de Src i el domini ARM d'E4orf4, que condueix a alteracions en ambdues proteïnes (Kleinberger, 2015). Aquesta associació provoca una desregulació de la senyalització de Src en vies de supervivència com FAK (quinasa d'adhesió focal) i ERK (quinases regulades per senyals extracel·lulars), fet que comportarà canvis en l'organització de les adherències focals i del citoesquelet d'actina, la formació de protuberàncies en la membrana i finalment la pèrdua de senyals de supervivència, que acabarà amb la mort cel·lular (Maddika et al., 2006). Es creu que aquests canvis podrien provocar també disfunció mitocondrial, que comportaria l'alliberament de citocrom C, caspasa-9 i finalitzaria amb la mort cel·lular, tot i que encara no està del tot clar i cal seguir realitzant estudis (Gupta et al., 2015).

Recentment, s'ha observat la interacció d'E4orf4 amb una altra proteïna citoplasmàtica, UDPasa, una apirasa de l'aparell de Golgi necessària per a la regulació de la importació dels sucres dins del lumen de l'aparell de Golgi que contribueix a la detenció irreversible del creixement induït per E4orf4. Es col·loca en la membrana de Golgi, amb l'extrem N-terminal i el seu domini catalític en el lumen i l'extrem C-terminal en la part citoplasmàtica de la membrana. Es va demostrar que E4orf4 estabilitza la proteïna UDPasa de forma dependent de PP2A i l'augment dels seus nivells augmenta la mort cel·lular induïda per E4orf4, mentre que una expressió reduïda inhibeix la toxicitat de E4orf4 (Kleinberger, 2015).



**Figura 3.** Representació dels mecanismes d'acció d'E4orf4. E4orf4 és fosforilat per quinases Src, fet que provoca que s'acumuli en el citoplasma i que es pugui associar a les quinases Src, formant un complex que regula la fosforilació de



varis factors, conduint a una remodelació del citoesquelet d'actina i de l'adhesió focal, a la formació de protuberàncies en la membrana i finalment a la mort cel·lular. E4orf4 en el citoplasma també interacciona amb UDPasa, que causa la mort per una via alternativa a la de Src. En el nucli interacciona amb la fosfatasa PP2A, complex que interactua amb ACF provocant la remodelació de la cromatina i amb APC, que provocarà la detenció en G2/M i catàstrofe mitòtica. Aquests processos desencadenaran en la mort cel·lular.

### 5.1.1.3. NS1 derivada de parvovirus-H1

Els virus del gènere Parvovirus són virus de DNA monocatenari sense envolta, amb una mida de genoma de 5 kb, el qual està format per dos ORF i gens superposats que codifiquen per dos gens no estructurals (NS1 i NS2) i dues proteïnes estructurals (VP1 i VP2) (Gupta et al., 2015).

Les propietats citotòxiques d'aquest virus vénen donades per la proteïna no estructural NS1, una proteïna multifuncional que presenta homologia entre diferents espècies de Parvovirus. Duu a terme diferents funcions, des de l'amplificació del DNA viral i la regulació de la transcripció fins a la citotoxicitat. Aquestes activitats estan regulades a través de la modificació posttraduccional de NS1 i la seva distribució subcel·lular. La fosforilació de diferents dominis NS1 controla les funcions enzimàtiques (ATPasa i helicasa) i no enzimàtiques, com la unió a DNA i proteïnes, del producte viral i varia durant la infecció (Nüesch, Lacroix, Marchini, & Rommelaere, 2012).

Els parvovirus es distingeixen per les seves activitats oncolítiques, una àmplia gama de tumors diana, la capacitat per eludir la resistència de les cèl·lules tumorals als inductors de mort convencionals i la idoneïtat per aplicacions locals i sistèmiques. Entre els parvovirus estudiats per les seves propietats anticancerígenes destaquen les espècies MVM i H-1PV (Nüesch et al., 2012). Diversos estudis preclínic han demostrat l'activitat oncosupressora de H-1PV tot i que ja s'han desenvolupat alguns assajos clínics amb H-1PV en pacients amb tumors cerebrals malignes (Geletneky et al., 2017).

#### Mecanismes d'acció

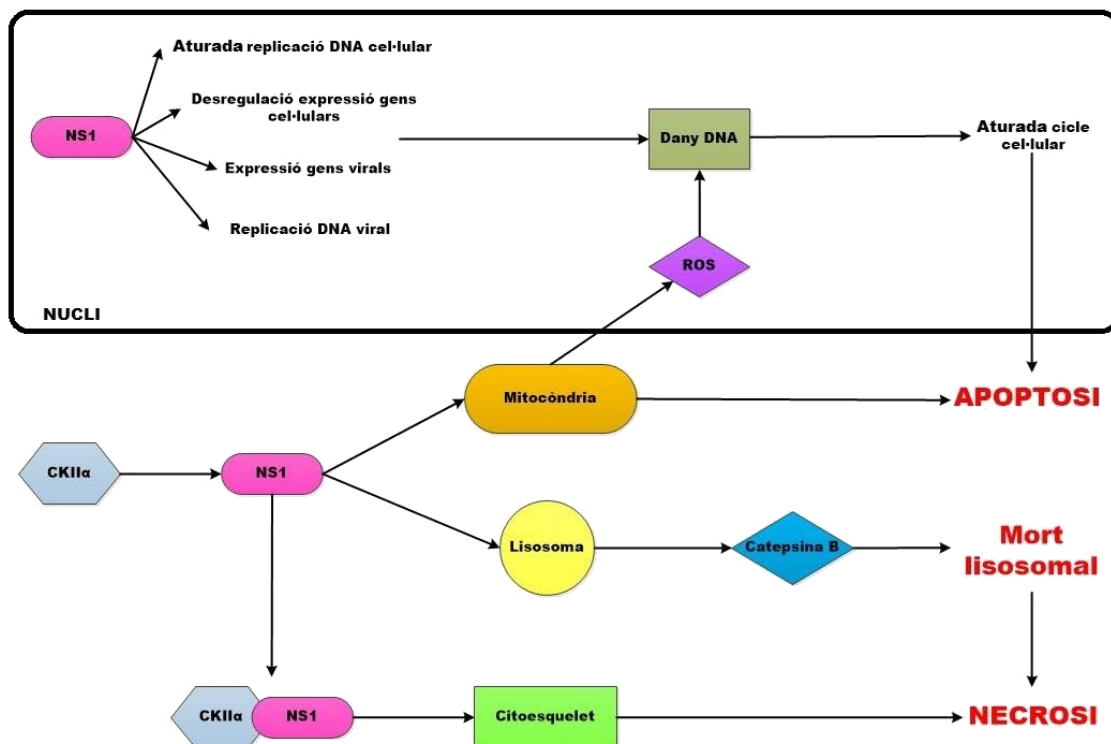
Dependent del tipus de cèl·lula i de l'estat metabòlic, les cèl·lules infectades per parvovirus poden morir per diferents mecanismes (**Figura 4**). Aquests mecanismes són apoptosi per la via intrínseca (activació de les caspases -9 i -3), necrosi i mort cel·lular dependent de cathepsina-B (Gupta et al., 2015). A més a més, pot induir la mort selectivament en cèl·lules cancerígenes independentment de si hi ha una sobreexpressió de la proteïna Bcl-2 (Noteborn, 2009). Les cèl·lules tumorals són més vulnerables a l'acció citotòxica de H-1PV perquè contenen nivells més elevats de múltiples determinants essencials per a la regulació oncotòxica de la proteïna NS1 de H-1PV, com factors de replicació i transcripció cel·lulars (Geletneky et al., 2017).

La infecció amb parvovirus causa la detenció de la síntesi de molècules de l'hoste, provocant la inhibició de la replicació del DNA cel·lular degut a la retenció dels components de la maquinària de replicació del DNA cel·lular en els centres de replicació viral, que activarà la resposta de dany al DNA induint la detenció del cycle cel·lular durant la infecció per a la reparació del DNA. L'expressió sola de la proteïna NS1 també ha demostrat ser suficient per induir la detenció del cycle cel·lular (Nüesch et al., 2012). NS1 provoca la detenció del cycle cel·lular en G2 a l'unir-se a factors de transcripció (Gupta et al., 2015).

En el citosol, la proteïna NS1 interacciona amb la subunitat catalítica de la caseïna quinasa II (CKII $\alpha$ ), fent que aquesta es pugui unir a la tropomiosina, provocant-li un patró alterat de fosforilació (Yun Chen & Qiu, 2011). Les cèl·lules tumorals infectades per parvovirus-H1 pateixen canvis en els filaments del citoesquelet, els quals són fosforilats per el complex NS1-CKII $\alpha$  conduint a la degradació de les fibres d'actina i a l'aparició dels anomenats "pegats d'actina" (*actin patches*), acabant amb la mort cel·lular. Les cèl·lules tumorals són resistents a la mort cel·lular induïda per NS1 si es produeix una inhibició de la CKII $\alpha$  (Grimm & Noteborn, 2010).

La proteïna NS1 també pot provocar la despolarització de la membrana mitocondrial i induir la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que causarà danys en el DNA, una detenció del cycle cel·lular i finalment apoptosi (Gupta et al., 2015).

Diferents estudis han demostrat que H-1PV pot matar cèl·lules tumorals a través d'un mecanisme de mort cel·lular no apoptòtic mediat per catepsines. Aquesta via provoca la permeabilització de la membrana lisosomal i l'alliberament d'enzims lisosòmics, en particular catepsina, al citosol (Yun Chen & Qiu, 2011). Això dona com a resultat l'acumulació citosòlica de catepsina a uns nivells intolerables per a la cèl·lula que la conduirà a la mort cel·lular. A través d'aquest mecanisme, el parvovirus pot induir la mort de les cèl·lules resistents a l'apoptosi (Nüesch et al., 2012).



**Figura 4.** Representació dels mecanismes per els quals la proteïna NS1 de parvovirus mata a les cèl·lules tumorals. En el nucli interactua amb factors cel·lulars implicats en la regulació del cycle cel·lular. A més, segresta la maquinària de la cèl·lula hoste per replicar-se ell mateix provocant una aturada en la replicació del DNA cel·lular, que comporta un dany en el DNA i una parada en el cycle i finalment l'apoptosi. En el citoplasma s'associa amb la caseïna quinasa CKII $\alpha$  i forma el complex NS1-CKII $\alpha$ , que fosforila els filaments del citoesquelet, provocant un col·lapse d'aquest i finalment la mort cel·lular. NS1 provoca la despolarització de la membrana mitocondrial, que comportarà a una producció excessiva de ROS, el qual provocarà danys al DNA i conduirà a l'apoptosi per la via intrínseca. També causa la permeabilització de la membrana lisosomal que comportarà una acumulació de catepsina B en el citoplasma i finalment la inducció de la mort cel·lular.

## 5.1.2. Proteïnes cel·lulars

A part de les proteïnes virals, s'han identificat varies proteïnes d'origen cel·lular que també poden induir la mort cel·lular selectivament en les cèl·lules tumorals. A continuació es presentaran algunes de les més importants.

### 5.1.2.1. MDA-7

La proteïna associada a la diferenciació de melanoma 7 (MDA-7), també coneguda com a interleucina 24 (IL-24), forma part de la família d'interleucina 10. Actua com a una citoquina clàssica i també com a un agent citotòxic intracel·lular independent de receptors (*Pavet et al., 2011*).

Actualment es troba en fase I d'assajos clínics, en els quals s'està observant que és ben tolerada i mostra activitat clínica significativa. S'estan estudiant tractaments en combinació amb radioteràpia i quimioteràpia per superar possibles resistències (*Grimm & Noteborn, 2010*).

#### **Mecanismes d'acció**

Es sap que MDA-7/IL-24 afecta a la viabilitat de les cèl·lules tumorals induint la seva mort però el mode exacte de com actua varia en els diferents tipus de cèl·lules cancerígenes. Tot i així, totes les rutes de senyalització (**Figura 5**) acaben convergint en apoptosi, amb l'activació de la via intrínseca com a conseqüència de l'alliberament de citocrom C i de l'activació de les caspases-9 i -3 (*Panneerselvam, Munshi, & Ramesh, 2013*).

Per tal que pugui dur a terme la seva activitat, cal que s'expressi dins les cèl·lules, concretament en el reticle endoplasmàtic provocant-li un estrès, fent que aquest orgànul pateixi una alteració en el seu funcionament (*Grimm & Noteborn, 2010*). MDA-7 indueix la mort cel·lular mitjançant l'activació de la quinasa del reticle endoplasmàtic de tipus PKR (PERK). La IL-24 evita la interacció entre la xaperona del reticle endoplasmàtic BiP/GRP78 i PERK, al unir-se ella a la xaperona. Així, PERK s'autofosforila i provoca la fosforilació i l'activació del factor d'iniciació de traducció eucariota 2 (EIF2 $\alpha$ ), que aturarà la traducció global de proteïnes. Hi haurà, doncs, una disminució de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques com Mcl-1, Bcl-XL, Bcl-2 i c-Flip (*Menezes et al., 2014*).

En estudis amb cèl·lules de càncer de pulmó tractades amb IL-24 es va observar l'activació de la proteïna quinasa dependent de RNA de doble cadena (PKR), gràcies a la unió de MDA-7 a la PKR, donant la fosforilació de ambdues proteïnes i provocant així la mort de les cèl·lules tumorals. Aquesta activació donava com a resultat la fosforilació d'altres proteïnes, com eIF2 $\alpha$  i la proteïna quinasa activada per mitògen p38 (p38MAPK), provocant una inhibició de la síntesi global de proteïnes. S'han realitzat altres estudis per tal de analitzar la necessitat de PKR per a la inducció de l'apoptosi mediada per MDA-7 i s'ha conclòs que és un requisit que depèn de cada tipus de cèl·lula, ja que en altres tipus de càncer pot exercir la seva activitat antitumoral independentment de PKR (*Panneerselvam et al., 2013*).

L'activació de PERK promou la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i de ceràmida. Això provoca un augment dels nivells de ceràmida en la cèl·lula que afectarà

a diverses vies de senyalització i a la integritat mitocondrial (Menezes et al., 2014). S'ha demostrat en varis estudis que es requereix ceramida per tal d'induir la mort cel·lular mitjançant MDA-7 (Argiris, Panethymitaki, & Tavassoli, 2011).

En cèl·lules de melanoma s'ha demostrat la importància de la inducció de la ruta de p38MAPK. La seva activació per MDA-7 condueix a una activació dels gens de detenció del creixement i dany del DNA (gens GADD), provocant l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi (Menezes et al., 2014). La fosforilació de eIF2 $\alpha$  també activa el factor de transcripció ATF4, que activarà els gens GADD. Aquest fet indica que existeix una relació entre PKR i les rutes de transducció de senyal p38MAPK (Dash et al., 2010).

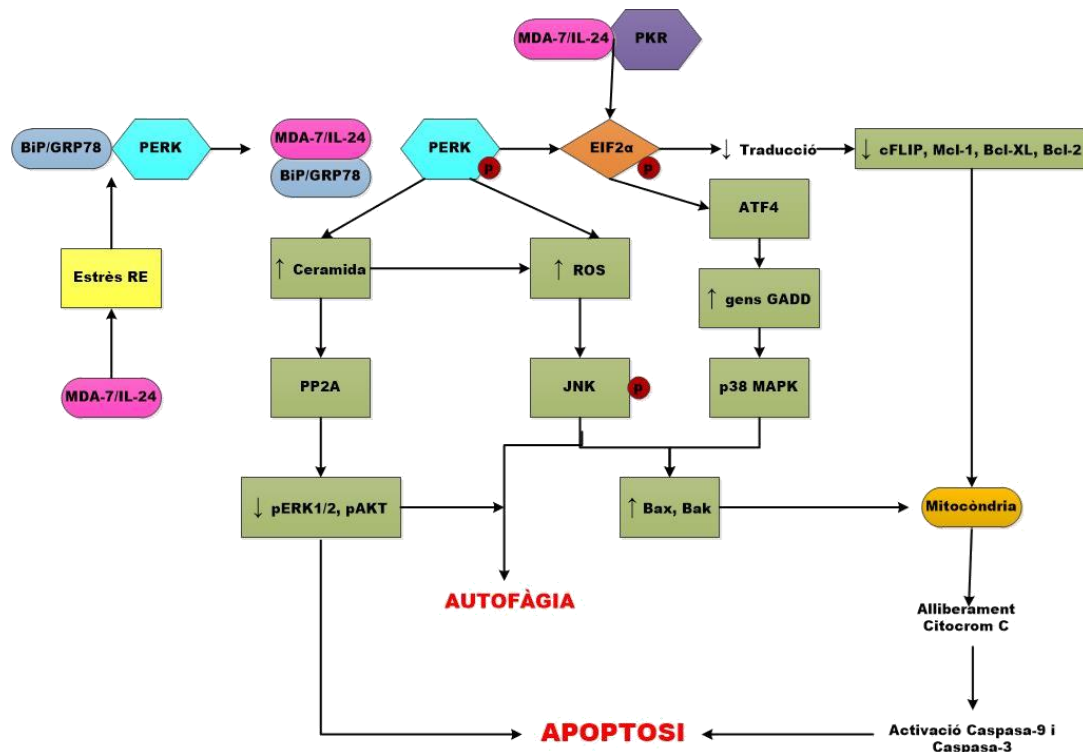
El tractament amb la interleucina estudiada, en altres cèl·lules ha provocat l'activació de la cascada de senyalització de la quinasa c-Jun NH2-terminal (JNK). L'activació de JNK promou l'expressió de les proteïnes proapoptòtiques Bax (proteïna assassina homòloga i antagonista de Bcl-2) i Bak (proteïna X associada a Bcl-2) i finalment condueix a la disfunció mitocondrial i a la mort cel·lular. Diversos estudis han demostrat la necessitat de JNK per a la mort de les cèl·lules cancerígenes induïda per MDA-7 (Panneerselvam et al., 2013).

A més, l'efecte antitumoral de mda-7 també està mediat per la seva capacitat per inhibir l'angiogènesi, la invasió i la migració de les cèl·lules cancerígenes (Dash et al., 2010).

La mort cel·lular induïda per MDA-7 implica tant apoptosi com autofàgia. L'autofàgia té un paper en la supervivència i en la mort cel·lular. El canvi de supervivència a mort es creu que depèn de l'estrès cel·lular, tot i que encara no hi ha gaires coneixements sobre el paper de MDA-7 en l'autofàgia. Varis estudis han mostrat que l'autofàgia mediada per IL-24 depèn de l'estrès del reticle endoplasmàtic mediat per PERK, que desencadena la producció de ceramida i ROS, com s'ha explicat anteriorment, fet que implica la inactivació de ERK 1/2 i l'activació de JNK (Panneerselvam et al., 2013).

Hi ha diferents hipòtesis per explicar la selectivitat de MDA-7 per a les cèl·lules tumorals. Les diferències bioquímiques entre les cèl·lules normals i les transformades pot ser una de les principals raons. Un dels principals mecanismes per els quals indueix la mort cel·lular és generant un estrès al reticle endoplasmàtic. Com les cèl·lules cancerígenes tenen nivells d'estrès del reticle endoplasmàtic més elevats en comparació amb les cèl·lules normals, les fa més susceptibles a la mort cel·lular induïda per MDA-7 (Menezes et al., 2014). A més, el nivell de BiP/GPR78 és més elevat en alguns tipus de cèl·lules cancerígenes que en les cèl·lules normals, fet que podria explicar perquè les primeres són més susceptibles a l'estrès causat per MDA-7 (Dash et al., 2010).

Una altra explicació d'aquesta selectivitat té a veure amb ROS. El nivell basal de ROS en les cèl·lules tumorals és major que en les cèl·lules normals. MDA-7 augmenta la producció de ROS, superant així els efectes antioxidants naturals més eficientment en les cèl·lules cancerígenes, el que comporta la mort cel·lular (Menezes et al., 2014).



**Figura 5.** Representació dels diferents mecanismes d'acció de la proteïna MDA-7 per induir l'apoptosi en cèl·lules tumorals. IL-24 s'associa amb la xaperona del reticle endoplasmàtic BiP/GPR78, fent que PERK no s'hi pugui unir i es fosforili. PERK provoca la fosforilació a EIF2 $\alpha$ , que afectarà a la traducció global de les proteïnes disminuint així els nivells de les proteïnes antiapoptòtiques (cFLIP, Mcl-1, Bcl-XL, Bcl-2). EIF2 $\alpha$  activarà també el factor de transcripció ATF4, que permetrà l'expressió dels gens GADD i activarà p38MAPK. PERK també promou la producció de ceramida i ROS, que activarà JNK i s'elevaran els nivells de les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak. Aquests processos anteriors afecten a la mitocondria, provocant un alliberament de Citocrom C i l'activació de les caspases-9 i -3, conduint finalment a l'apoptosi de la cèl·lula tumoral. JNK i ERK 1/2 també poden desencadenar la mort cel·lular per autofàgia.

### 5.1.2.2. TRAIL

El lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el factor de necrosi tumoral (TRAIL) indueix apoptosi independentment de p53 preferentment en cèl·lules tumorals (Noteborn, 2009).

Es tracta d'una proteïna transmembrana de tipus II amb un domini N-terminal citoplasmàtic curt i una domini d'unió a receptor extracel·lular C-terminal llarg. S'uneix com un homotrímer a la part extracel·lular dels seus quatre receptors específics units a la membrana. Es pot unir a dos receptors inductors d'apoptosi, TRAIL-R1 (DR4) i TRAIL-R2 (DR5, KILLER), a dos receptors addicionals incapaçs de transmetre el senyal apoptòtic, TRAIL-R3 (LIT, DcR1) i TRAIL-R4 (TRUNDD, DcR2), i a un receptor soluble anomenat osteoprotegerina (OPG) (Falschlehner, Emmerich, Gerlach, & Walczak, 2007).

Tant DR4 com DR5 tenen un domini de mort conservat (DD) i són receptors proapoptòtics. DcR1 no conté domini intracel·lular i DcR2 té el domini DD alterat. D'aquesta forma, aquests dos últims receptors actuen com a receptors esquers provocant la resistència i supervivència de la cèl·lula tumoral perquè competeixen amb els altres receptors per a la unió del lligand (Wu, 2009). OPG, en canvi, és una proteïna secretada i actua com un regulador en el desenvolupament i l'activació d'osteoclasts en

la remodelació òssia. Però la importància de la interacció de TRAIL i OPG encara és desconeguda (*Falschlehner et al., 2007*).

Actualment es troba en fases I i II d'assajos clínics en tractaments de monoteràpia o combinat amb altres agents terapèutics. TRAIL està mostrant molt poca o cap toxicitat en les cèl·lules normals i els tractaments són ben tolerats (*Argiris et al., 2011*).

### **Mecanismes d'acció**

El mecanisme d'actuació de TRAIL per induir l'apoptosi està bastant definit i es presenta a la **Figura 6**.

La unió de TRAIL als seus receptors TRAIL-R1 o TRAIL-R2 provoca la trimerització del receptor i la formació del complex de senyalització inductor de mort (DISC). La proteïna associada a FAS amb domini de mort (FADD) s'uneix als dominis de mort de C-terminal dels receptors. Llavors, FADD recluta caspases iniciadores pròximes a la membrana, com la caspasa-8, a través del seu domini efector de mort (DED) (*Johnstone, Frew, & Smyth, 2008*). Aquestes caspases iniciadores s'activen de manera autocatalítica permetent la transmissió del senyal apoptòtic promovent l'activació de la caspasa-3, la qual podrà trencar vàries proteïnes cel·lulars per conduir finalment a l'apoptosi de la cèl·lula per la via extrínseca, i de la proteïna proapoptòtica Bid (proteïna amb el domini agonista de mort que interactua amb BH3), que iniciarà la via intrínseca (*Falschlehner et al., 2007*).

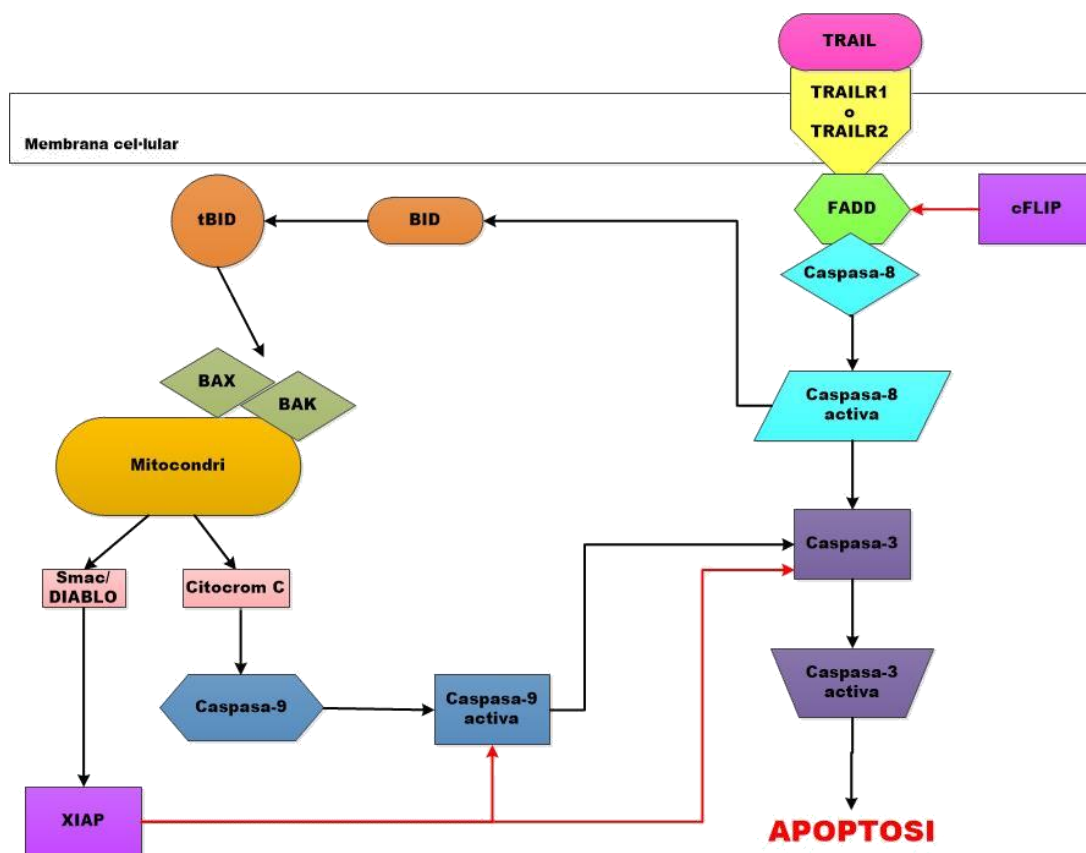
Les proteïnes de la família Bcl-2 s'agrupen en tres subfamílies les quals comparteixen quatre dominis característics, anomenats dominis d'homologia Bcl-2 (BH), importants per a la seva funció. La primera subfamília la conformen les proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-XL, les quals conserven els quatre dominis BH i estan associades a la membrana mitocondrial externa per estabilitzar la seva integritat. Les proteïnes proapoptòtiques es poden dividir entre les que tenen varis dominis BH, com Bax i Bak, i les que només conserven el domini BH3, com per exemple Bid, Bim i Bad. Les proapoptòtiques amb varis dominis BH només s'associen a la membrana mitocondrial externa durant l'apoptosi amb l'objectiu de desestabilitzar la seva integritat per tal que alliberi factors proapoptòtics. Aquestes són activades per la tercera subfamília, les que només contenen un domini BH, les quals a més d'activar les proteïnes proapoptòtiques, també poden interactuar amb les antiapoptòtiques per neutralitzar la seva funció (*Falschlehner et al., 2007*).

Així doncs, la caspasa-8 activada s'uneix a Bid provocant-li una escissió (tBid) que li permetrà desplaçar-se a la mitocòndria i interaccionar amb Bax i Bak per poder activar la via apoptòtica intrínseca, que provocarà l'alliberament de citocrom C i altres factors propapoptòtics com Smac/DIABLO. Depenent del tipus de cèl·lula, aquesta ruta pot funcionar com a principal mecanisme utilitzat per TRAIL per induir l'apoptosi o bé pot servir per amplificar la resposta apoptòtica mitjançant l'activació de les vies apoptòtiques extrínseca i intrínseca (*Johnstone et al., 2008*).

Hi ha diferents mecanismes que inhibeixen la cascada d'apoptosi induïda per TRAIL en varis nivells. L'activació de les caspases iniciadores pot ser inhibida per la proteïna inhibidora semblant a la caspasa FLICE (cFLIP), la qual té tres variants (cFLIPL, cFLIPS i cFLIPR) que contenen dos DED homòlegs als DED de la caspasa-8. Les variants cFLIPS i cFLIPR competeixen amb la caspasa-8 per unir-se a FADD inhibint l'activitat

proapoptòtica de DISC. Un altre mecanisme de control és mitjançant les proteïnes antiapoptòtiques de la família Bcl-2, que controlen l'activitat de les proapoptòtiques Bax i Bak (Lemke, Karstedt, Zinngrebe, & Walczak, 2014).

Les proteïnes inhibidores d'apoptosi (IAP), com cIAP-1, cIAP-2 i XIAP, conformen un altre mecanisme que bloqueja l'apoptosi, inhibint les caspases. XIAP (proteïna inhibidora d'apoptosi lligada a X) inhibeix la caspasa-3 unint-se al seu lloc actiu, impedit la unió de la caspasa amb el seu substrat. També pot inhibir la caspasa-9, deixant-la en un estat inactiu. XIAP catalitza la ubiquitinització de la caspasa-3 i Smac, fet que promou la degradació d'ambdues molècules proapoptòtiques. Les IAP són contrarestades per Smac /DIABLO ja que competeix amb les caspases per unir-se a IAP (Falschlehner, Emmerich, Gerlach, & Walczak, 2007).



**Figura 6.** Representació del mecanisme d'acció de TRAIL. Quan TRAIL s'uneix als receptors TRAIL-R1 o TRAIL-R2 recluta FADD i a la caspasa-8, la qual s'activa. cFLIP competeix amb la caspasa-8 per unir-se a FADD, provocant una inhibició de l'apoptosi induïda per TRAIL (en vermell en la imatge). La caspasa iniciadora activada actua sobre caspases efectores com la caspasa-3 que conduiran a la mort cel·lular per la via extrínseca. També es pot activar la via intrínseca de l'apoptosi per així ampliar la senyalització apoptòtica mitjançant l'escissió de Bid per la caspasa-8 que li permetrà anar a la mitocondria i interactuar amb Bax i Bak, que induiran la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'alliberament de citocrom C i Smac/DIABLO al citosol. El citocrom C activarà la caspasa-9 i podrà activar la caspasa-3. Smac/DIABLO s'uneix a XIAP per inhibir la seva funció (assenyalada en vermell en la figura).

### 5.1.3. Comparació de les diferents proteïnes

**Taula 1.** Comparativa de les diferents proteïnes que maten selectivament les cèl·lules tumorals.

	Apoptina	E4orf4	NS1	MDA-7	TRAIL
Dependència de p53	No	No	No	No	No
Bloquejat per Bcl-2	?*	No	No	Sí	Si
Principal lloc de localització cel·lular	Nucli	Nucli Citoplasma	Nucli Citoplasma	Reticle endoplasmàtic	Unió a receptor de membrana
Principals tipus de mort cel·lular	Apoptosi via intrínseca	Apoptosi Catàstrofe mitòtica	Apoptosi via intrínseca Necrosi Mort lisosomal	Apoptosi via intrínseca Autofàgia	Apoptosi via extrínseca / intrínseca
Estat terapèutic	Preclínic	Preclínic	Preclínic	Clínic fases I i II	Clínic fases I i II

\*Procés encara no prou ben conegut. Presenta controvèrsia.

En la **Taula 1** es mostra un resum dels aspectes més importants de cada proteïna per tal de poder-ne fer una comparació.

Pel que fa a la proteïna supressora de tumors p53, els diversos estudis han revelat que cap de les proteïnes descrites en aquest treball presenta una dependència del seu estat, mentre que en el cas de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 hi ha més diversitat. Dintre de les proteïnes virals, els mecanismes de mort cel·lulars induïts per E4orf4 i NS1 no es bloquegen quan hi ha una sobreexpressió de Bcl-2, mentre que en el cas de les proteïnes cel·lulars succeeix el contrari. Pel que fa a la proteïna viral apoptina, com ja s'ha comentat anteriorment, ha presentat resultats contradictoris i cal seguir investigant per poder saber l'efecte que té la proteïna antiapoptòtica sobre els seus mecanismes de mort cel·lular.

La localització cel·lular també és un factor que difereix entre les diferents proteïnes, localitzant-se les proteïnes virals en el nucli, podent-se trobar E4orf4 i NS1 també en citoplasma. Dintre de les proteïnes cel·lulars, MDA-7 actua en el reticle endoplasmàtic provocant-li un estrès que desencadena la mort cel·lular mentre que TRAIL s'uneix al seu receptor ancorat a la membrana plasmàtica, des d'on inicia la via d'apoptosi.

El principal mecanisme de mort cel·lular de totes les proteïnes és l'apoptosi. En excepció de E4orf4, les altres poden activar la via intrínseca de l'apoptosi. En el cas de TRAIL, la via extrínseca també és activada, donant-se així una complementació de les dues vies que permet potenciar la resposta de mort cel·lular. E4orf4 pot activar la catàstrofe mitòtica per provocar la mort cel·lular mentre que NS1, a més de l'apoptosi per la via intrínseca, també pot provocar necrosi i mort lisosomal. La proteïna cel·lular MDA-7 també pot provocar autofàgia en les cèl·lules tumorals.



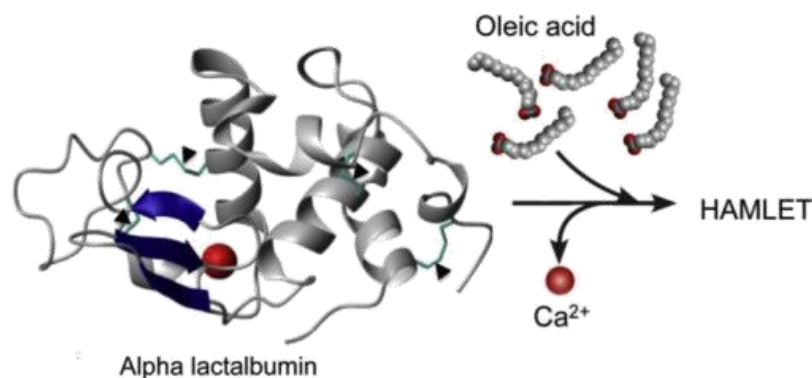
L'últim factor a comparar entre les diferents proteïnes que maten selectivament les cèl·lules tumorals és el seu estat terapèutic. Pel que fa a les proteïnes cel·lulars, tant MDA-7 com TRAIL, es troben en assajos clínics en fases I i II. Les proteïnes virals, en canvi, encara s'estan estudiant en estudis preclínics.

## 5.2. HAMLET

### 5.2.1. Descobriment i estructura

L'activitat de HAMLET ( $\alpha$ -lactalbúmina humana letal per a les cèl·lules tumorals) va ser descoberta per casualitat mentre s'utilitzaven fraccions de llet materna per investigar com les bacteries s'uneixen a les línies cel·lulars de carcinoma de pulmó (Svanborg et al., 2003). A més de bloquejar l'adherència, una fracció de la llet va ser capaç de matar les cèl·lules tumorals per inducció d'apoptosi (Singh, Suryawanshi, Joshi, Limaye, & Kadam, 2012). Aquesta activitat es va observar en la fracció de caseïna, la qual es va obtenir per tractament de la llet a un pH baix. Un fraccionament addicional va revelar que el complex molecular actiu contenia  $\alpha$ -lactalbúmina (Hallgren et al., 2008).

L' $\alpha$ -lactalbúmina és la proteïna més abundant en la llet materna humana. Es tracta d'una proteïna globular de 14 kDa estabilitzada per quatre ponts disulfur i un ió calci divalent, la seva estructura està formada per dos dominis  $\alpha$ -hèlix C- i N-terminals separats per un domini de full  $\beta$  format per tres cadenes  $\beta$  (James C.S. Ho, Nadeem, & Svanborg, 2017). La proteïna nativa actua com un coenzim en la síntesi de la lactosa però no provoca la mort de les cèl·lules tumorals. Per tornar-se tumoricida, la proteïna ha de patir un desplegament parcial, alliberant l'ió calci que té unit, i unir-se a un cofactor d'àcid gras, que li permet malgrat estar parcialment desplegada mantenir-se estable en condicions fisiològiques (Figura 7). En absència de l'àcid gras, l'estat desplegat és inestable i reverteix al seu estat natiu (Singh et al., 2012). Aquesta forma parcialment desplegada de l' $\alpha$ -lactalbúmina estabilitzada per unió a l'àcid gras i que presenta funció citotòxica es va anomenar HAMLET.

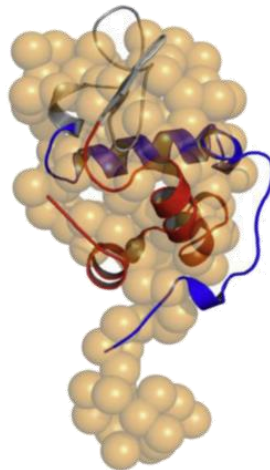


**Figura 7.** Formació del complex HAMLET. L'estructura de la part proteica de HAMLET es manté completament plegada gràcies a la presència del  $\text{Ca}^{2+}$  (en vermell a la imatge) i la presència de quatre ponts disulfur (indicats per les puntes de fletxa). Per a que es formi el complex cal l'alliberament de l'ió calci que permet que l'estructura proteica es desplegui parcialment i així es pugui unir a 4-8 molècules d'àcid oleic. Font: J. C. S. Ho, Nadeem, & Svanborg, 2017.

HAMLET és un complex molecular derivat de la llet humana, format per  $\alpha$ -lactalbúmina parcialment desplegada i àcid oleic, que mata les cèl·lules tumorals per apoptosi (Argiris

*et al.*, 2011). L'especificitat del cofactor lipídic es va investigar utilitzant àcids grassos de diverses longituds de la cadena de carboni, amb diferents saturacions o conformacions cis/trans. Es va identificar que els àcids grassos amb cadenes de 18 carbonis insaturats i que presentaven una conformació en cis eren els que interactuaven amb l' $\alpha$ -lactalbúmina parcialment desplegada per formar HAMLET, sent l'àcid oleic (C18;1,9 cis) l'únic capaç de formar un complex estable que indueixi apoptosi (*Singh et al.*, 2012).

L'estructura de HAMLET s'ha resolt a baixa resolució emprant dispersió de raig X de baix angle (SAXS). S'ha observat que el complex, que existeix en forma de monòmer, presenta un domini globular gran i un domini C-terminal estès (**Figura 8**) (*Ho CS, Rydstrom, Manimekalai, Svanborg, & Grüber, 2012*). La part proteica del complex es troba parcialment plegada al voltant de les molècules d'oleat que es troben en el centre del complex. L'àcid gras es troba en forma monomèrica lliure, la qual cosa fa que tant les membranes cel·lulars com les proteïnes de membrana siguin especialment sensibles a aquesta molècula.



**Figura 8.** Estructura de HAMLET obtinguda a baixa resolució utilitzant SAXS. Font: J. C. S. Ho, Nadeem, & Svanborg, 2017.

### 5.2.2. Mecanismes d'acció

Els mecanismes per els quals HAMLET indueix la mort en les cèl·lules tumorals encara són poc coneguts però s'ha vist que envaeix les cèl·lules i interactua amb varis orgànuls cel·lulars (mitochondries, proteasomes, nuclis i reticle endoplasmàtic), activant així diferents vies de mort cel·lular en paral·lel (**Figura 9**). Aquest fet podria explicar l'àmplia activitat antitumoral de HAMLET. A més, la mort cel·lular induïda per HAMLET és independent de la sobreexpressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2, Bcl-XL i de l'estat cel·lular de p53 (*C. S. Ho, 2014*).

#### Dianes de HAMLET a la membrana cel·lular

Tant les cèl·lules normals sanes com les tumorals mostren una unió superficial ràpida de HAMLET, observant-se la seva translocació al citoplasma en ambdós tipus de cèl·lules però amb diferent eficàcia. En les cèl·lules cancerígenes s'acumulen grans quantitats de HAMLET que formen agregats citoplasmàtics mentre que en les cèl·lules normals només s'observa una mica d'absorció. L'acumulació massiva de HAMLET en

el citoplasma i el seu posterior desplaçament a la regió perinuclear és una característica que es dona a les cèl·lules tumorals, acumulant-se finalment en els nuclis (*Pagare, Joshi, Patil, & Kadam, 2012*).

S'ha demostrat que HAMLET s'integra en les membranes de les cèl·lules tumorals i pertorba la seva integritat, provocant elongació i canvis en la fluïdesa d'aquestes. A més, provoca una escapada de contingut vesicular, suggerint una permeabilització de la membrana. HAMLET altera els fluxos de  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$ , que provocaran l'activació de diferents vies de mort cel·lular, tot i que aquests processos són encara poc coneguts i controvertits (*C. S. Ho, 2014*).

Una hipòtesi que s'ha proposat per explicar l'entrada de HAMLET a les cèl·lules considera que existeix una dissociació entre l'oleat i la proteïna. L'àcid gras, per la seva naturalesa, s'insereix a la membrana cel·lular incrementant la seva flexibilitat. Això facilita la translocació del component proteic de HAMLET, ajudat pel fet que aquest es manté en una estructura parcialment desplegada. No obstant, no s'ha fet cap experiment per seguir l'entrada de l'oleat a la cèl·lula ja sigui tot sol o formant part de HAMLET per poder saber si es queda a la membrana, entra a la cèl·lula sol o acompanyat de l' $\alpha$ -lactalbúmina (*Rath et al., 2015*).

### **Dianes intracel·lulars de HAMLET**

S'ha observat que els efectes de HAMLET promouen l'activació de la via p38MAPK i paral·lelament es dona una inhibició de la fosforilació de ERK 1/2, indicant que hi ha un canvi de proliferació a inducció de mort cel·lular. Aquests resultats són conseqüència del fet que HAMLET desencadena fluxos d'ions letals en les cèl·lules tumorals, al contrari del que succeeix en les cèl·lules no transformades. S'ha comprovat, mitjançant anàlisis proteòmic (*J. C.S. Ho, Nadeem, Rydström, Puthia, & Svanborg, 2016*), que HAMLET presenta afinitat per motius moleculars conservats, la qual cosa explica la multitud de dianes que HAMLET presenta en les cèl·lules tumorals. Entre aquestes, s'ha identificat un gran nombre de proteïnes d'unió a nucleòtids, entre les quals es troben 3 ATPases, 24 membres de la família Ras de GTPases i 111 quinases. Aquests resultats identifiquen HAMLET com un inhibidor de quinases i GTPases amb especificitat per les cèl·lules tumorals (*James C.S. Ho et al., 2017*).

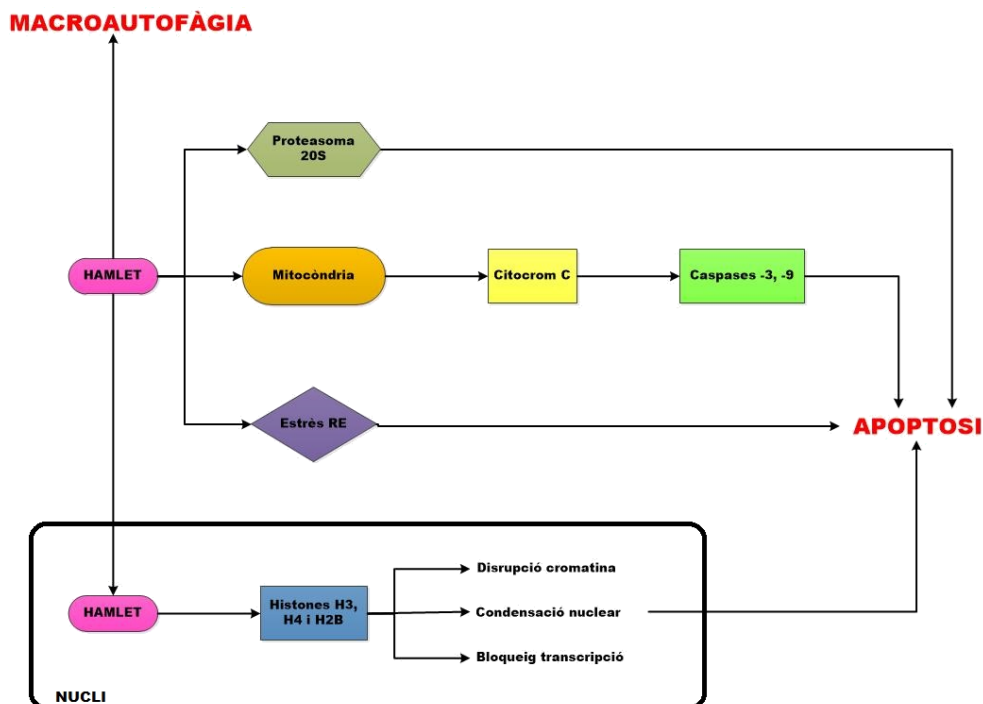
Un cop ha estat internalitzat en les cèl·lules tumorals, en el nucli HAMLET interacciona amb les seves dianes nuclears, les histones H2B, H3 i H4 i interfereix en la formació de nucleosomes. La seva interacció amb les histones provoca la disrupció de la cromatina, la condensació nuclear i l'aturada de la transcripció (*Hallgren et al., 2008*). La sensibilitat de les cèl·lules es veu afectada per l'acetilació de la cromatina, ja que els inhibidors d'histona desacetilasa (HDAC) obren la cromatina a l'acció de HAMLET, la qual cosa provoca perturbacions en la seva estructura, conduint a la mort cel·lular (*James C.S. Ho et al., 2017*). Els inhibidors HDAC potencien els efectes citotòxics de HAMLET incloent la contracció de la cromatina, el dany del DNA i la fragmentació del DNA (*Mok, Pettersson, Orrenius, & Svanborg, 2007*).

En el citoplasma interactua amb un dels seus varis objectius, les mitocondries, provocant una inflamació i despolarització de les membranes mitocondrials, alliberament de citocrom C, activació de les caspases -3 i -9 i exposició de fosfatidilserina en la part externa de la membrana plasmàtica. Aquest fet, en els primers estudis realitzats va

suggerir que les cèl·lules morien per apoptosi iniciada a nivell de les mitocondries, però l'ús de l'inhibidor de caspasa ZVAD no va salvar les cèl·lules tumorals de la mort, demostrant que la mort cel·lular induïda per HAMLET no depèn de les caspases i que existeix un mecanisme de mort alternatiu (James C.S. Ho et al., 2017).

HAMLET es localitza amb els proteasomes en el citoplasma i nucli de les cèl·lules tumorals. Els proteasomes són els encarregats de la degradació de proteïnes endògenes mal plegades. HAMLET ataca als proteasomes 20S, fent que sigui degradat menys eficientment per els enzims proteasomals. Inhibeix l'activitat del proteasoma 20S i li provoca canvis estructurals, fet que podria contribuir a la mort cel·lular induïda per HAMLET (C. S. Ho, 2014). S'ha hipotetitzat que HAMLET també pot provocar estrès al reticle endoplasmàtic degut a una sobrecàrrega de proteïna desplegada en el citosol, que conduirà a la mort de la cèl·lula (Mok et al., 2007).

Recentment, s'ha demostrat que les cèl·lules presenten canvis morfològics compatibles amb la macroautofàgia, com la vacuolització del citoplasma, procés que podria estar involucrat en la resposta de mort cel·lular induïda per HAMLET, coneguda com mort cel·lular autofàgica. Es tracta d'una via catabòlica lisosomal que recicla molècules cel·lulars. Durant la macroautofàgia, porcions del citoplasma i orgànuls s'envolten en sacs de membrana formant vesícules de doble membrana, anomenades autofagosomes, que es fusionaran amb els lisosomes. Els enzims lisosòmics degradaran el contingut dels autofagosomes per a la seva reutilització. La macroautofàgia s'incrementa en resposta a l'estrès cel·lular. Es va observar una disminució de la mort cel·lular induïda per HAMLET al inhibir la macroautofàgia amb un RNA d'interferència contra Beclin-1, un gen autofàgic implicat en la formació de l'autofagosoma, suggerint que es tracta d'una via que contribueix a la mort cel·lular induïda per HAMLET (Singh et al., 2012).



**Figura 9.** Mecanismes principals per els quals es creu que HAMLET induïx la mort de les cèl·lules tumorals. HAMLET pot activar paral·lelament diverses vies de mort al interactuar amb diversos orgànuls cel·lulars. En el citoplasma, HAMLET interacciona amb el proteasoma 20S, el reticle endoplasmàtic i les mitocondries, a les que li provoca una pertorbació de

la membrana que comporta un alliberament de citocrom C i l'activació de les caspases -3 i -9, induint l'apoptosi de la cèl·lula tumoral. En el nucli, interacciona amb les histones H3, H4 i H2B provocant una disrupció de la cromatina, condensació nuclear i un bloqueig de la transcripció que finalitzarà amb la mort apoptòtica. Estudis recents han demostrat característiques cel·lulars relacionades amb la macroautofàgia, suggerint que es tracta d'un altre mecanisme de mort cel·lular induït per HAMLET.

### 5.2.3. Efectes terapèutics

HAMLET ha demostrat una àmplia activitat antitumoral *in vitro* i s'ha provat la seva eficàcia terapèutica *in vivo* en models animals de glioblastoma, càncer de còlon i càncer de bufeta. També s'han dut a terme dos assajos clínics controlats amb placebo en pacients amb papil·lomes de la pell i càncer de bufeta (*James C.S. Ho et al., 2017*). Aquests estudis mostren que l'administració local de HAMLET pot tenir un gran potencial en el tractament de càncer en un futur ja que no s'han observat efectes secundaris tòxics en els teixits sans, tant en els pacients com en els animals tractats. L'únic inconvenient de la teràpia amb HAMLET és la necessitat de ser administrada localment, fet que restringeix l'espectre de tumors contra els quals pot ser dirigida. És necessari realitzar més estudis per conèixer bé els mecanismes de mort cel·lular induïda per HAMLET i els sistemes alternatius de producció i administració per tal d'explotar el seu potencial com a agent terapèutic (*Argiris et al., 2011*). A continuació es descriuen alguns dels resultats obtinguts tant en models animals com en clínica.

#### Models animals

Es van realitzar xenoempelts de cèl·lules de glioblastoma humà en rates. La regió del tumor va ser infosa amb HAMLET o  $\alpha$ -lactalbúmina a través d'una cànula connectada a una mini bomba osmòtica. A les 24h ja es va observar un retràs dràstic del desenvolupament del tumor i de l'aparició de símptomes de pressió. Es va demostrar que el complex HAMLET desencadenava apoptosi en el teixit tumoral i no semblava provocar danys en el cervell normal ni símptomes neurològics (*Ho Cs et al., 2012*).

Així mateix, per avaluar si HAMLET és eficaç com agent terapèutic tòpic en el càncer de bufeta, ratolins amb càncer de bufeta es van tractar amb instil·lacions locals de HAMLET. Utilitzant la mida del tumor com a punt final terapèutic, es va detectar un efecte terapèutic significatiu de HAMLET (*Ho Cs et al., 2012*). Es va observar una reducció en el desenvolupament del tumor en comparació amb els ratolins control que van rebre  $\alpha$ -lactalbúmina o tampó fosfat i a més, mitjançant fluorescència, van veure que la proteïna queda retinguda en els teixits tumorals però no en els sans que envolten el tumor (*James C.S. Ho et al., 2017*).

També s'ha investigat l'eficàcia de HAMLET en un model de càncer de còlon humà en ratolins. L'administració de HAMLET per via oral va provocar una reducció de la progressió del tumor i de la mortalitat. A més, va prevenir significativament el desenvolupament de tumors (*C. S. Ho, 2014*).

#### Estudis clínics

Es va provar el tractament tòpic de papil·lomes de la pell amb HAMLET com a primer estudi amb humans utilitzant un estudi controlat amb placebo. A pacients amb papil·lomes de la pell resistents a la teràpia convencional se'ls va administrar per via tòpica HAMLET o placebo (solució salina) diàriament durant tres setmanes. Després del

primer assaig, tant el grup placebo com el grup tractat van rebre HAMLET durant tres setmanes més. El volum dels papil·lomes del grup tractat amb HAMLET des de el principi va disminuir més del 75%, mentre que en el grup placebo es va reduir un 15% (Ho Cs et al., 2012). Quasi tots els papil·lomes tractats van desaparèixer després del tractament, aproximadament en el 83% dels pacients després de dos anys (James C.S. Ho et al., 2017). El temps de resolució va ser menor en el grup tractat amb HAMLET des del principi en comparació amb el grup placebo i no es van detectar reaccions adverses, concloent que el tractament tòpic amb HAMLET té un efecte beneficiós i durador en els papil·lomes (Ho Cs et al., 2012).

D'altra banda, es va estudiar si instil·lacions intravesicals de HAMLET podien matar cèl·lules cancerígenes *in vivo*. Nou pacients amb càncer de bufeta van rebre injeccions de HAMLET en la bufeta durant cinc dies consecutius la setmana prèvia a la cirurgia. Els pacients controls van rebre  $\alpha$ -lactalbúmina, PBS o NaCl. En els pacients tractats es va detectar una resposta ràpida amb una excreció de cèl·lules tumorals a l'orina diàriament durant els cinc dies, mentre que en els controls no es va observar aquest abocament de cèl·lules. A més, es va observar una reducció significativa de la mida del tumor en 8 dels 9 pacients tractats i cèl·lules apoptòtiques en les mostres de biòpsia (Mok et al., 2007). Aquests resultats van mostrar que HAMLET té un efecte directe i selectiu sobre el càncer de bufeta i que la seva administració local pot provocar una reducció ràpida en la massa tumoral (Ho Cs et al., 2012).

### 5.3. Ètica i sostenibilitat

Aquest treball no presenta implicacions ètiques o de sostenibilitat de cap tipus al tractar-se d'una revisió bibliogràfica. No obstant això, s'han utilitzat diverses fonts bibliogràfiques, les quals estan correctament citades en el text, complint la Llei de la Propietat Intel·lectual, regulada per el Real Decret Legislatiu 1/1996, de 12 d'abril.

## 6. CONCLUSIONS

Although tumour cells have developed mechanism to evade cell death pathways these ways can be rewired by the tumour-selective apoptosis-inducing proteins described in this project. All these proteins act independently of the p53 tumour suppressor protein and some of them are also not affected by an overexpression of the Bcl-2 anti-apoptotic protein, being able to act against a wide variety of types of tumour cells, suggesting that these apoptosis-inducing proteins have a high therapeutic potential.

The success of the first clinical trials using proteins that naturally kill tumour cells confirm that these proteins, used alone or in combination with other therapies, will be result in new improved strategies against cancer. However, despite showing promising results, the mechanisms of action of these proteins and the mode of tumour selectivity are still not poor known. In addition, the cell death mechanism varies from one type of cell to another. Therefore, more basic research is still needed to understand the mechanisms of these proteins and to develop tools to exploit their selectivity for future therapy.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Argiris, K., Panethymitaki, C., & Tavassoli, M. (2011). Naturally occurring, tumor-specific, therapeutic proteins. *Experimental Biology and Medicine*, 236(5), 524–536. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011004>
- Barras, D., & Widmann, C. (2011). Promises of Apoptosis-Inducing Peptides in Cancer Therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 1153–1165. <https://doi.org/10.2174/138920111796117337>
- Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E. V., & Barry, M. A. (2008). Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nature Reviews Microbiology*, 6(7), 529–540. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1927>
- Dash, R., Bhutia, S. K., Azab, B., Su, Z. zhong, Quinn, B. A., Kegelman, T. P., ... Fisher, P. B. (2010). Mda-7/IL-24: A unique member of the IL-10 gene family promoting cancer-targeted toxicity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(5), 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.08.004>
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., & Walczak, H. (2007). TRAIL signalling : Decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1462–1475. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.02.007>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Geletneky, K., Hajda, J., Angelova, A. L., Leuchs, B., Capper, D., Bartsch, A. J., ... Rommelaere, J. (2017). Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Molecular Therapy*, 25(12), 2620–2634. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>
- Grimm, S., & Noteborn, M. (2010). Anticancer genes: inducers of tumour-specific cell death signalling. *Trends in Molecular Medicine*, 16(2), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.12.002>
- Gupta, S. K., Gandham, R. K., Sahoo, A. P., & Tiwari, A. K. (2015). Viral genes as oncolytic agents for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1073–1094. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1782-1>
- Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.-K., Wullt, B., & Svanborg, C. (2008). Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (Human lactalbumin made lethal to tumor cells). *Bioactive Components of Milk*, 217–218.
- Ho, C. S. (2014). *The Structure and Function of HAMLET: Epitopes , Membrane Interactions and Molecular Recognition*. Lund University, Sweden.
- Ho, J. C. S., Nadeem, A., Rydström, A., Puthia, M., & Svanborg, C. (2016). Targeting of nucleotide-binding proteins by HAMLET - A conserved tumor cell death mechanism. *Oncogene*, 35(7), 897–907. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.144>
- Ho, J. C. S., Nadeem, A., & Svanborg, C. (2017). HAMLET – A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 454–458. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.10.092>
- Ho CS, J., Rydstrom, A., Manimekalai, M. S. S., Svanborg, C., & Grüber, G. (2012). Low Resolution Solution Structure of HAMLET and the Importance of Its Alpha-Domains in Tumoricidal Activity. *PLoS ONE*, 7(12).



<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053051>

- Ho Cs, J., Rydström, A., Trulsson, M., Bålfors, J., Storm, P., Puthia, M., ... Svanborg, C. (2012). HAMLET: functional properties and therapeutic potential. *Future Oncology*, 8(10), 1301–1313. <https://doi.org/10.2217/FON.12.122>
- Hu, W., & Kavanagh, J. J. (2003). Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet. Oncology*, 4(12), 721–729. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01277-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01277-4)
- Johnstone, R. W., Frew, A. J., & Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 782–798. <https://doi.org/10.1038/nrc2465>
- Kleinberger, T. (2015). Mechanisms of cancer cell killing by the adenovirus E4orf4 protein. *Viruses*, 7(5), 2334–2357. <https://doi.org/10.3390/v7052334>
- Lemke, J., Karstedt, S. Von, Zingrebe, J., & Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1350–1364. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.81>
- Los, M., Panigrahi, S., Rashedi, I., Mandal, S., Stetefeld, J., Essmann, F., & Schulze-Osthoff, K. (2009). Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(8), 1335–1342. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.002>
- Maddika, S., Mendoza, F., Hauff, K., Zamzow, C., Paranjothy, T., & Los, M. (2006). Cancer-Selective Therapy of the Future. *Cancer Biology and Therapy*, 5(1).
- Menezes, M. E., Bhatia, S., Bhoopathi, P., Das, S. K., Emdad, L., Dasgupta, S., ... Fisher, P. B. (2014). MDA-7/IL-24: Multifunctional Cancer Killing Cytokine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 818, 127–153. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6458-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6458-6_6)
- Mok, K. H., Pettersson, J., Orrenius, S., & Svanborg, C. (2007). HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.167>
- Noteborn, M. H. M. (2009). Proteins selectively killing tumor cells. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.068>
- Nüesch, J. P. F., Lacroix, J., Marchini, A., & Rommelaere, J. (2012). Molecular pathways: Rodent parvoviruses - Mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 18(13), 3516–3523. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2325>
- Pagare, M. S., Joshi, H., Patil, L., & Kadam, V. J. (2012). Human milk: Excellent anticancer alternative. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 5(1), 14–19.
- Panneerselvam, J., Munshi, A., & Ramesh, R. (2013). Molecular targets and signaling pathways regulated by interleukin (IL)-24 in mediating its antitumor activities. *Journal of Molecular Signaling*, 8(December 2013). <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-15>
- Pavet, V., Portal, M. M., Moulin, J. C., Herbrecht, R., & Gronemeyer, H. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene*, 30(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.460>

- Rath, E. M., Duff, A. P., Håkansson, A. P., Vacher, C. S., Liu, G. J., Knott, R. B., & Church, W. B. (2015). Structure and potential cellular targets of HAMLET-like anti-cancer compounds made from milk components. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *18*(4), 773–824. <https://doi.org/10.18433/J3G60C>
- Russell, S. J., & Peng, K. W. (2008). The utility of cells as vehicles for oncolytic virus therapies. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, *10*(4), 380–386. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683103>
- Singh, S., Suryawanshi, A., Joshi, Y., Limaye, D., & Kadam, V. (2012). Human milk: Excellent anticancer alternative. *International Journal of Research in Pharmacy and Technology*, *2*(3), 575–584.
- Svanborg, C., Ågerstam, H., Aronson, A., Bjerkvig, R., Düringer, C., Fischer, W., ... Svensson, M. (2003). HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism - Cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Advances in Cancer Research*, *88*, 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(03\)88302-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(03)88302-1)
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *30*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Wu, G. S. (2009). TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Letters*, *285*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.029>
- Yun Chen, A., & Qiu, J. (2011). Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest, *5*(6), 731–743. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.56.Parvovirus>