

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**O MECANISMO DE AÇÃO DA ECTEINASCIDINA-743 E  
SUA INTERAÇÃO COM A REPARAÇÃO DO DNA.**

TESE DE DOUTORADO

DANIELE GRAZZIOTIN SOARES

Porto Alegre, 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**O MECANISMO DE AÇÃO DA ECTEINASCIDINA-743 E SUA  
INTERAÇÃO COM A REPARAÇÃO DO DNA.**

Daniele Grazziotin Soares

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, novembro de 2007.



***“We totally missed the possible role of...  
[DNA] repair although... I later came to realize  
that DNA is so precious that probably many  
distinct repair mechanisms would exist”.***

Francis Crick, *Nature*, 26 de abril de 1974, 23 anos após a  
elucidação da dupla hélice do DNA.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof Dr João Antonio Pêgas Henriques** pela confiança depositada em meu trabalho. Pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Pela compreensão dos momentos difíceis pelos quais passamos durante o início deste projeto. Pela alegria de trabalharmos juntos. Obrigada por ser este pesquisador brilhante e despertar em seus alunos o interesse científico e a vontade de contribuir com a ciência. Agradeço também pela sua liberdade de orientação que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Por sua amizade, principalmente.

A **Dra Annette Larsen** que me orientou durante o período de estágio na França. Por sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de orientação e discussão de idéias. Além disso, agradeço por sua amizade e pelo auxílio que me concedeu para permanência na França por alguns meses suplementares.

A **Prof Dra Mirian Salvador** que contribuiu de forma intensa para a minha formação desde a orientação de Mestrado. Obrigada por ceder o seu laboratório para o desenvolvimento da primeira parte deste trabalho e por sempre disponibilizar este espaço para a realização dos nossos projetos.

Ao **Prof Dr Martin Brendel** que juntamente com a Dr Mirian Salvador fez parte da minha Comissão de Acompanhamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (**PPGBCM-UFRGS**) pelas oportunidades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro durante o período em que permaneci na França.

A **Universidade de Caxias do Sul** por conceder o período de afastamento possibilitando a realização do estágio de doutorado (sanduíche).

A todos os colegas do laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes que colaboraram desde o início do meu trabalho, em especial a **Nadine Paese Poletto** que participou intensamente do desenvolvimento do primeiro capítulo desta tese. Obrigada também a **Queli Defaveri Varella** que me ajudou muito com as linhagens de levedura.

Aos colegas dos laboratórios 210 e 219 da UFRGS onde realizei parte dos experimentos, especialmente ao **Dr Diego Bonatto** que me orientou no desenvolvimento de novas técnicas.

Aos colegas do Hospital Saint-Antoine, em especial a **Dra Virginie Poindessous** que me recebeu na França e desde o início me orientou no laboratório e por todas as dicas de sobrevivência neste maravilhoso país.

A minha colega e amiga **Valéria Weiss Angeli** por entender os motivos pelos quais eu faltava algumas reuniões do colegiado e por outras tantas jantares e almoços onde filosofamos sobre a vida. Agradeço também a todos os outros amigos e colegas da UCS os quais não citarei os nomes para não ocupar muitas linhas. A eles agradecerei pessoalmente.

A minha família: **pai, mãe, cissa, tati e chico**.

Ao meu marido **Alexandre** que me auxiliou durante as minhas atividades de laboratório na França, e principalmente pela sua compreensão de vir ao Brasil possibilitando que eu finalizasse a minha tese. Merci beaucoup à Fête de la Musique!

## APRESENTAÇÃO

A primeira parte deste trabalho foi realizada nas dependências do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da Universidade de Caxias do Sul e do Laboratório de Radiobiologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A segunda parte foi desenvolvida no Laboratório *Group of Molecular and Clinical Cancer Therapeutics*, França. O projeto foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo GENOTOX-Royal (Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia da UFRGS), pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul (PPGP-UCS) e pelo *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM).

## ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Esta tese está dividida da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos (gerais e específicos), dois capítulos escritos na forma de artigos científicos contendo uma página de apresentação sobre o assunto, uma discussão geral, as conclusões (gerais e específicas) e as perspectivas.

Após um breve comentário sobre os tratamentos quimioterápicos do câncer, a introdução apresenta os principais sistemas de reparação de DNA que estão envolvidos com o mecanismo de ação da droga estudada. Dando sequência, a introdução aborda os estudos sobre o agente alquilante ecteinascidina-743 (ET-743). Nesta seção estão descritos desde a descoberta dos extratos do tunicado marinho de onde foi isolada a ET-743 até as aplicações clínicas deste medicamento.

O capítulo 1 descreve um estudo realizado com ET-743 utilizando como modelo eucariótico as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Neste capítulo, linhagens celulares mutantes da levedura foram usadas como ferramenta para identificar vias de reparação de DNA possivelmente envolvidas com a ação farmacológica da ET-743. Este capítulo foi publicado na revista *Biochemical Pharmacology*.

O capítulo 2 apresenta um estudo realizado em células de mamíferos tratadas com ET-743. Os experimentos realizados durante este trabalho possibilitaram identificar a via de recombinação homóloga como sendo um dos sistemas responsáveis pela reparação dos danos gerados pela ET-743. Esta e

outras conclusões foram publicadas na forma de artigo na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Em seguida, está apresentada uma discussão geral onde são comentados os resultados obtidos nos dois capítulos e a sua importância para a contribuição científica deste estudo. Após, aparecem as conclusões e as perspectivas geradas por este trabalho.

No anexo encontra-se um artigo de revisão sobre a ecteinascidina-743 e outros compostos desta família. Este artigo foi publicado na revista *Drug Design Review – Online* durante o período de realização desta tese.



## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS-----	XI
RESUMO-----	XIII
ABSTRACT-----	XIV
<b>I. INTRODUÇÃO-----</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUÇÃO GERAL-----	2
1.2 MECANISMOS DE REPARAÇÃO DE DNA-----	6
1.2.1 Reparação por excisão de bases-----	9
1.2.2 Reparação por excisão de nucleotídeos-----	15
1.2.3 Reparação de DSBs: recombinação homóloga e reparação não-homóloga---	21
<i>Recombinação homóloga</i> -----	23
<i>Reparação não-homóloga</i> -----	25
1.2.4 Síntese de DNA translesão-----	29
1.3 A ECTEINASCIDINA 743-----	32
1.3.1 A descoberta dos extratos de <i>Ecteinascidia turbinata</i> -----	32
1.3.2 Estudos químicos-----	33
1.3.3 Mecanismo de ação-----	37
<i>Ligação ao DNA</i> -----	37
<i>Interação com proteínas de ligação no DNA</i> -----	39
<i>Interferência com mecanismos de reparação de DNA</i> -----	42
<i>Interferência no ciclo celular e apoptose</i> -----	44
<i>Combinação com outros agentes</i> -----	48
<i>Metabolismo e toxicidade</i> -----	50
1.3.4 Atividade antitumoral e ensaios clínicos-----	52
1.3.5 Outras propriedades farmacológicas-----	53
<b>II. OBJETIVOS-----</b>	<b>55</b>
2.1 OBJETIVO GERAL-----	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	56
<b>III. CAPÍTULO 1-----</b>	<b>57</b>
<b>APRESENTAÇÃO-----</b>	<b>58</b>
<i>Biochem Pharmacol 70 : 59–69, 2005</i> -----	60

<b>IV. CAPÍTULO 2</b> -----	71
<b>APRESENTAÇÃO</b> -----	72
<i>Proc Natl Acad Sci USA 104(32) : 13062-13067, 2007</i> -----	74
<b>V. DISCUSSÃO</b> -----	82
<i>A interferência do BER na citotoxicidade da ET-743</i> -----	83
<i>A tolerância dos danos gerados pela ET-743 e a indução de mutações</i> -----	87
<i>A geração de DSBS e o papel da recombinação homóloga na reparação dos danos causados pela ET-743</i> -----	90
<i>Modelo para o mecanismo de ação da ET-743 em células eucarióticas sensíveis e resistentes ao tratamento</i> -----	94
<b>VI. CONCLUSÕES</b> -----	97
<b>6.1 CONCLUSÃO GERAL</b> -----	98
<b>6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS</b> -----	98
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b> -----	102
<b>VIII. REFERÊNCIAS</b> -----	105
<b>IX. ANEXO</b> -----	132
<b>X. Curriculum vitae</b> -----	158

## LISTA DE ABREVIATURAS

3'dRP	extremidade 3' desoxiribose fosfato
3'OH	extremidade 3'OH
5'P	extremidade 5' fosfato
6-4 PPs	Fotoprodutos 6-4
8-oxoG	8-oxoguanina
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i> (proteína mutada ataxia telangiectasia)
ATR	<i>ATM-/Rad3-related protein</i> (proteína relacionada a ATM)
BER	<i>base excision repair</i> (reparação por excisão de bases)
CPDs	dímeros de pirimidina ciclobutano
CS	Cockayne syndrome (síndrome de Cockayne)
CYPs	enzimas do citocromo P450
DHU	5-hidroxicitosina diidroureacil
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i> (subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA)
DOX	doxorubicina
DSB	double strand breaks (quebras duplas de fita de DNA)
ERO	espécies reativas de oxigênio
ET-743	(ecteinascidin 743) ecteinascidina 743
Fapy	formamidopirimidina
FapyG	formamidopirimidina guanina
FEN1	5' flap endonuclease 1
GG-NER ou GGR	<i>global genome repair</i> (reparação do genoma global)
HPLC	<i>(high performance liquid chromatography)</i> cromatografia líquida de alta eficiência
HR	<i>homologous recombination</i> (recombinação homóloga)
ICL	<i>interstrand crosslinks</i> (ligações cruzadas)
MMR	<i>mismatch repair</i> (reparação de erros de emparelhamento de bases)

MS	( <i>mass spectrometry</i> ) espectrometria de massa
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América)
NEFs	fatores de reparação por excisão de nucleotídeos
NER	<i>nucleotide excision repair</i> (reparação por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (reparação não-homóloga)
NMR	( <i>nuclear magnetic resonance</i> ) ressonância nuclear magnética
NSCLC	<i>non-small cells lung cancer</i> (tumour de pulmão não-pequenas células)
OGG1	DNA glicosilase de 8-oxo guanina
PARP	poli(ADP)ribose polimerase
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
Pol $\beta$	DNA polimerase $\beta$
RFC	Fator de replicação C
RPA	<i>replication protein A</i> (proteína de replicação A)
SSB	<i>single strand breaks</i> (quebras simples de fita de DNA)
ssDNA	<i>single strand DNA</i> (fita simples de DNA)
STS	<i>soft tissue sarcomas</i> (sarcoma de tecidos moles)
TC-NER	<i>transcription coupled NER</i> (NER acoplado a transcrição)
TFIIH	fator de transcrição envolvido no NER
Tg	timina glicol
TLS	<i>translesion synthesis</i> (síntese translesão)
TTD	tricotiodistrofia
XP	<i>xeroderma pigmentosum</i> (xeroderma pigmentoso)

## RESUMO

A ecteinascidina-743 (ET-743) é um alcalóide marinho que tem apresentado potente atividade antitumoral contra uma variedade de tumores humanos, incluindo sarcomas, câncer de mama e de ovário. Em resposta aos resultados promissores que a ET-743 tem mostrado na clínica, o seu mecanismo de ação vem sendo amplamente investigado. Sabe-se que a ET-743 se liga na volta menor do DNA e influencia a dinâmica da hélice. Neste trabalho, o mecanismo de ação da ET-743 foi estudado em modelos eucarióticos de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em células de mamíferos, incluindo linhagens tumorais humanas. A utilização do modelo de levedura revelou que o sistema de reparação por excisão de bases está envolvido com o mecanismo de citotoxicidade da ET-743. Além disso, o emprego de mutantes de levedura permitiram explicar como ocorre a tolerância e a reparação dos danos gerados pela ET-743 nas linhagens que são resistentes à ação da droga. Além do mecanismo molecular proposto, este trabalho proporcionou uma possível explicação para a especificidade da ET-743 em tumores do tipo sarcomas. Considerando que a resistência dos sarcomas à maioria das drogas clássicas seja devido a superexpressão de APE1, entre outros fatores, e que a ausência desta proteína torna as células eucarióticas resistentes à ET-743, os resultados obtidos nesta tese contribuem para explicar por que sarcomas, tumores que superexpressam esta proteína, são sensíveis ao tratamento com ET-743. Além dos dados envolvendo o BER, este estudo permitiu explicar como ocorre o processamento da lesão gerada pela ET-743 no DNA. A utilização de linhagens celulares de mamíferos com deficiências em proteínas específicas combinado a técnicas bioquímicas e moleculares revelaram que a ET-743 forma adutos no DNA que são convertidos em uma lesão secundária durante a replicação do DNA. Pela primeira vez foi mostrado que a ET-743 induz a formação de quebras duplas dependentes de replicação e que o sistema de recombinação homóloga é responsável pela reparação destes danos. Os dados obtidos neste trabalho indicam que a funcionalidade das vias de reparação de DNA é uma ferramenta útil para prever a resposta clínica da droga e, dessa forma, contribuir na seleção de pacientes que mais podem se beneficiar do tratamento.

## ABSTRACT

Ecteinascidin 743 is a marine alkaloid that has shown potent antitumor activity against several human tumor types, including soft tissue sarcomas, breast and ovarian cancer. Because of these promising data, there is a strong interest in evaluating its mechanism of action. ET-743 binds to the minor groove of DNA and induces helix unwinding. Here, we studied its mechanism of action in both yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells, including human tumor cell lines. Using the yeast model, we have demonstrated that the base excision repair pathway is strongly involved in ET-743 cytotoxicity. Moreover, this work clarified how ET-743-induced DNA damages can be tolerated and repaired in yeast resistant cell lines. In addition to the molecular model we have suggested to explain the mechanism of action of ET-743, this work brings new insights to explain the specificity of ET-743 towards soft tissue sarcomas. Indeed, sarcomas, while resistant to most of the chemotherapeutic agents, over-express APE1. Thus, the involvement of APE1 in cell killing, could explain why sarcomas, as well as tumors expressing high levels of APE1, are sensitive to the treatment with ET-743. This work was extended to mammalian cells in order to better understand the processing of the ET-743-induced DNA damage. Molecular and biochemical experiments were combined and revealed that the primary ET-743 DNA-adducts is transformed in DNA double strand breaks, a secondary type of more toxic DNA lesion. This formation is entirely dependent on the progression of the DNA replication fork. The use of mammalian cell lines, deficient in specific repair proteins, demonstrated for the first time that these lesions were uniquely processed by the homologous recombination repair pathway. Thus, our data establish a new rational, based on the measure of the expression levels of selected repair factors, both to predict clinical response and to facilitate the selection of the patients particularly likely, or not, to benefit from the treatment with ET-743.

# I. INTRODUÇÃO

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A instabilidade genética é uma das principais causas envolvidas na progressão da carcinogênese. Diversos agentes endógenos e exógenos, aos quais estamos expostos diariamente, são capazes de causar danos no DNA e perturbar a integridade da transmissão da informação genética e a manutenção genômica dos organismos (Hoeijmakers, 2001b). A exposição dos indivíduos a agentes genotóxicos e a geração de danos no DNA, bem como, a capacidade das células de responder a estes danos são determinantes críticos no processo de desenvolvimento do câncer (Ishikawa et al., 2006).

Estudos sobre anormalidades cromossômicas em células de câncer têm mostrado que as células tumorais contêm centenas de mutações casuais, fenômeno conhecido por “fenótipo mutador” (Venkatesan et al., 2006). Esta hipótese sugere que o acúmulo de mutações em genes que governam a fidelidade da síntese e a eficiência da reparação do DNA (*caretaker genes*) ou ainda, em genes que codificam para a síntese de proteínas que controlam o ciclo celular ou induzem apoptose (*gatekeeper genes*) contribuem para aumentar consideravelmente a taxa de mutação durante o processo de tumorigênese (Sarasin, 2003).

A maior parte das terapias anticâncer usadas nos dias de hoje, particularmente a radiação ionizante e certas classes de agentes quimioterapêuticos, causam morte celular por danificar o DNA (Sharma e Dianov, 2007). Estes agentes podem gerar quebras no DNA (de uma única fita: *single strand break*, SSB ou de fita dupla: *double strand break*, DSB) através da formação de ligações com o DNA (alquilações mono ou bi-funcionais) ou interferir com proteínas que interagem com o DNA, como por exemplo as topoisomerases. Após a administração destes agentes, a resposta



celular para as lesões geradas inicia-se através da detecção do dano e da subsequente indução de vias de sinalização que conduzem a paradas do ciclo celular e ao reparo. No caso de danos muito severos, a célula dispõe ainda uma via apoptótica que induz a morte celular (revisado em Damia e D’Incalci, 2007).

Em vista disto, a funcionalidade das enzimas de reparação de DNA é muito importante na determinação da sensibilidade celular aos agentes antitumorais. A resistência celular a agentes que causam dano ao DNA tem sido associada com o aumento da atividade da reparação de DNA, enquanto que defeitos nas vias de reparação induzem a hipersensibilidade a estas drogas (Damia e D’Incalci, 2007). Por exemplo, é bem conhecido que defeitos nas proteínas chaves envolvidas na via de reparação por recombinação homóloga (HR) estão associados com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama e de ovário. Tumores deficientes em BRCA1 e BRCA2 mostram sensibilidade aumentada a agentes que geram ligações cruzadas (*interstrand crosslinks*, ICL), como o agente alquilante bifuncional mitomicina C e os compostos análogos de platina, cisplatina e carboplatina (Turner et al., 2005). Estas proteínas tem papel central na regulação inicial das DSBs e o seu processamento pelo complexo M/R/N, bem como, no auxílio da invasão da fita danificada em direção a fita homóloga para promover a reparação da lesão (Helleday et al., 2007).

O envolvimento do supressor de tumor BRCA não é o único exemplo de genes de reparação de DNA envolvidos na predisposição ao câncer. Recentemente tem sido relatado que deficiências no sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER) estão associadas ao câncer testicular e que este tipo de tumor é parcialmente sensível a cisplatina. O mesmo ocorre com tumores de pulmão não-pequenas células (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) deficientes na proteína

ERCC1. ERCC1 é um dos fatores limitantes do NER, também envolvido na remoção dos adutos de platina do DNA (Damia e D'Inclaci, 2007). Estudos em células de mamíferos têm mostrado que os adutos de platina no DNA são processados por componentes dos sistemas NER, HR e síntese de DNA translesão (TLS). Defeitos em uma destas vias resulta em aumento da sensibilidade celular à cisplatina (revisado em Chaney et al., 2005).

Por outro lado, mutações em genes das vias de reparação de DNA também podem promover resistência a determinadas drogas quimioterápicas. Deficiências no sistema de malpareamento de bases (*mismatch repair* ou MMR) causam resistência aos antimetabólitos, agentes metilantes e compostos platinados. Estudos mostram que decréscimos na atividade do MMR são capazes de aumentar a eficiência da síntese translesão através de adutos de cisplatina no DNA, induzindo mutações secundárias que conferem resistência à droga (Chaney et al., 2005).

Entender e explorar as razões genéticas pelas quais alguns tumores respondem a determinados tratamentos enquanto que outros não, é o papel central da pesquisa biológica e médica. Muitos dos agentes antitumorais convencionais matam as células por causar danos ao DNA ou interferir com a divisão celular. Sendo que estas drogas não são seletivas para as células cancerosas, os pacientes geralmente apresentam uma diversidade de efeitos adversos. Neste sentido, tentando reduzir os efeitos indesejáveis dos agentes antitumorais, esforços estão sendo feitos para atacar diretamente as células cancerosas tirando proveito de seus defeitos em proteínas envolvidas nas vias de reparação de DNA ou usando como alvo as proteínas envolvidas na resposta de bloqueio do ciclo celular (Yarden e Papa, 2006).

Atualmente, com os avanços da tecnologia moderna e os crescentes entendimentos sobre a biologia celular, uma variedade de novas drogas com diferentes mecanismos de ação têm sido propostas. Apesar disto, ainda é necessário compreensão mais detalhada acerca do mecanismo de ação destas drogas a fim de serem eficientemente administradas ao paciente e contribuir como terapia efetiva contra o câncer.

## 1.2 MECANISMOS DE REPARAÇÃO DE DNA

Os genes estão armazenados na forma de DNA, molécula que carrega todas as informações vitais para o funcionamento das células e manutenção dos organismos intactos. Uma alta fidelidade na transmissão da informação genética é necessária para garantir o desenvolvimento normal dos diferentes organismos (Hoeijmakers, 2001a; Sarasin e Monier, 2003). Contudo, o DNA está sujeito a diversos tipos de danos que podem ser resultantes da ação de agentes físicos, químicos e biológicos. Por exemplo, a luz ultravioleta (UV) e a radiação ionizante induzem dímeros de pirimidina e promovem quebras duplas na hélice do DNA, respectivamente. Compostos tóxicos presentes nos alimentos ou na fumaça do cigarro, bem como, agentes quimioterapêuticos, alteram a estrutura química do DNA e interferem com a sua função. Além disso, agentes biológicos como as espécies reativas do oxigênio (ERO), produzidos pelo metabolismo normal da célula, também são uma importante fonte de danos. Como consequência destes processos, cerca de 10.000 lesões ocorrem diariamente no DNA (Hoeijmakers, 2001a).

Os danos no DNA têm consequências imediatas e a longo prazo. Lesões nas fitas transcritas de genes que estão sendo usados pela célula, levam a bloqueio dos processos de transcrição o que impede a geração de um RNA mensageiro e, conseqüentemente, da proteína. Quando a molécula de DNA danificada é duplicada existe grande probabilidade deste erro ser convertido em mutações que alteram a informação genética. Estas mutações induzem ao câncer, doenças hereditárias e envelhecimento precoce (Hoeijmakers, 2001b).

Felizmente, a estrutura da dupla hélice do DNA é considerada um bom substrato para a reparação, uma vez que quando uma das fitas não sofreu dano, ela

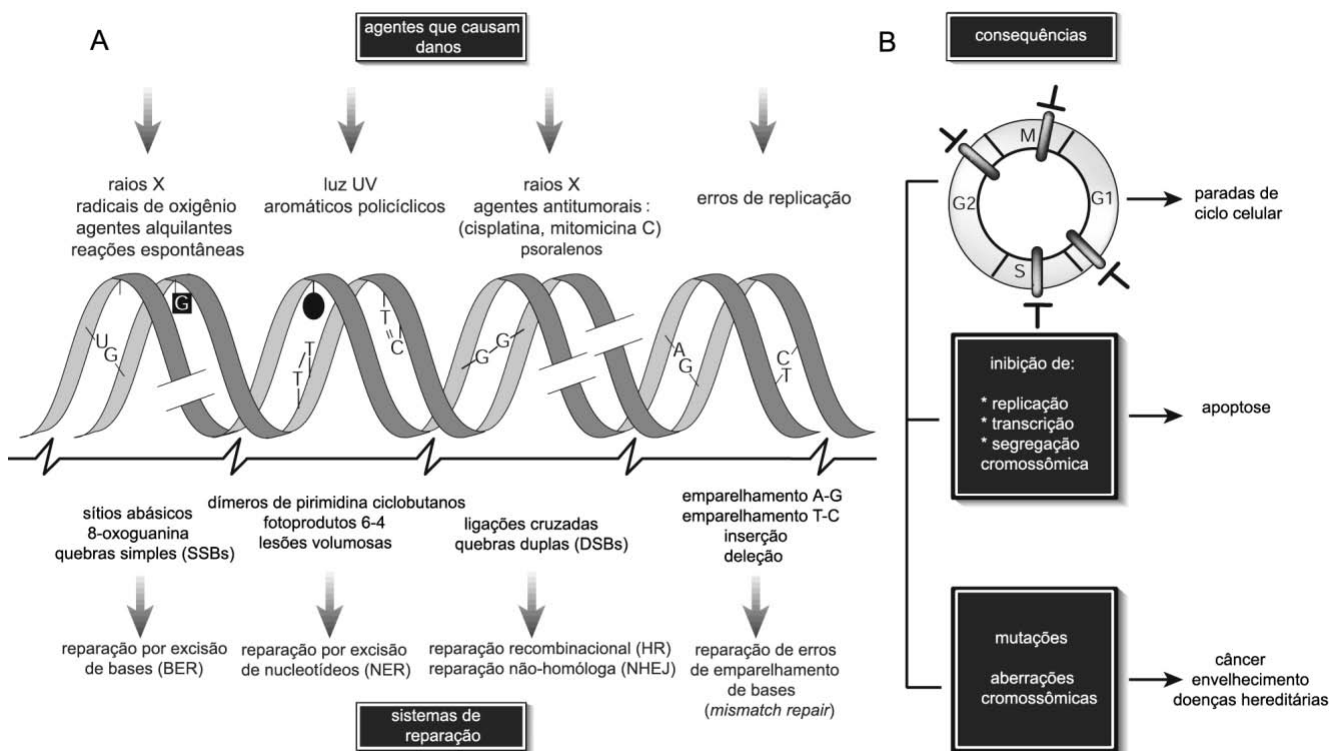
pode ser usada como molde para reconstituir a fita danificada (Friedberg, 2003; Hanawalt, 2003; Sarasin e Monier, 2003).

Diversos mecanismos protegem o DNA dos danos e previnem suas consequências deletérias. As chamadas vias de reparação de DNA são capazes de reconhecer um dano e removê-lo da molécula. Além disso, as células são capazes de impedir a progressão do ciclo celular através de bloqueio da replicação e da segregação dos cromossomos. Ainda, dependendo da complexidade e severidade do dano, as células utilizam um mecanismo final de segurança que induz à morte celular, a apoptose (Hoeijmakers, 2001b). Um esquema dos principais danos do DNA, seus mecanismos de reparo e as consequências destes processos pode ser visto na **Figura 1**.

Atualmente, é conhecido que a reparação do DNA não envolve somente a reversão direta do dano (como por exemplo a fotoreação enzimática de dímeros de timina), mas também outros dois distintos mecanismos, chamados de *reparação por excisão* (excisão de nucleotídeos: NER, excisão de bases: BER e excisão de erros de emparelhamento de bases: MMR) e *reparação de quebras duplas* (recombinação homóloga: HR e reparação não-homóloga: NHEJ). Além disso, as células dispõem de um mecanismo de tolerância de danos, a *síntese translesão* (TLS) que envolve a participação de DNA polimerases de baixa fidelidade capazes de replicar o DNA passando através da lesão (Friedberg, 2003).

As vias de reparação de DNA não são exclusivas para reparar os diferentes tipos de danos, isto é, pode haver interação entre dois ou mais sistemas na remoção de um dano. E, ainda, não somente as proteínas de reparo podem participar em diferentes vias, mas outras proteínas que desempenham funções celulares específicas podem se ligar ao DNA e influenciar o curso da reparação. Por exemplo,

RPA (*replication protein A*) é requerida para iniciação de origens de replicação e funciona também no NER (revisado em Cline e Hanawalt, 2003). Assim também ocorre com as proteínas histonas, que estão envolvidas na sinalização para a remodelagem da cromatina facilitando o acesso dos complexos de reparação (Downs et al., 2007).



**Figura 1. Danos no DNA, mecanismos de reparação e consequências. A)** agentes que causam dano no DNA (parte superior); lesões induzidas por estes agentes (meio); principais mecanismos de reparação responsáveis pela remoção das lesões (parte inferior). **B)** efeitos agudos dos danos na progressão do ciclo celular, conduzindo a paradas nas fases G1, S, G2 ou M (parte superior) e no metabolismo do DNA (meio). Consequências do danos a longo prazo (parte inferior) incluem alterações permanentes na sequência do DNA (mutações pontuais que afetam um único gene ou aberrações cromossômicas que devem envolver diversos genes) e seus efeitos biológicos (adaptado de Hoeijmakers, 2001b).

### 1.2.1 Reparação por excisão de bases

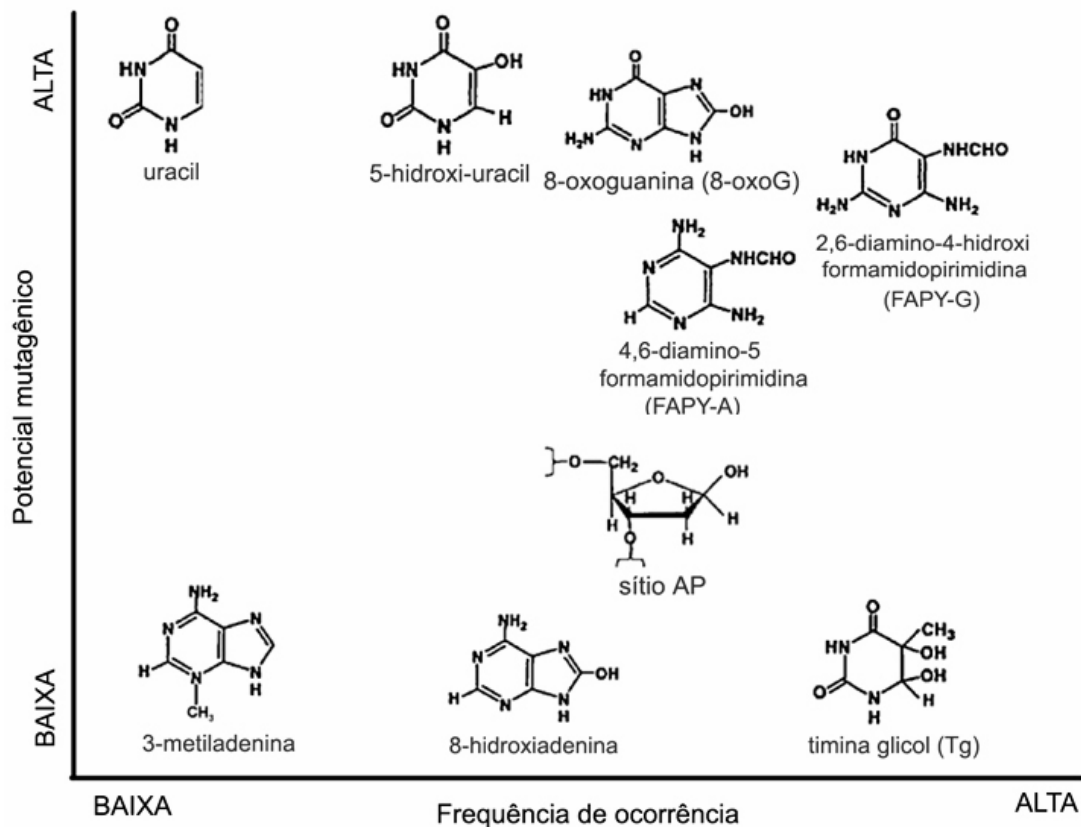
Nos organismos eucarióticos, a reparação por excisão de bases (BER) é o principal mecanismo para reparar lesões promovidas por alquilações e danos oxidativos no DNA. Bases danificadas podem ser formadas a partir de bases normais como resultado de metilação, oxidação ou desaminação, gerando uma variedade de lesões (Boiteux e Guillet, 2004). As bases modificadas que mais prevalecem no DNA são a 8-oxoguanina (8-oxoG), a timina glicol (Tg) e as formamidopirimidinas (Fapy) (Wilson e Bohr, 2007). A 8-oxoG é uma base altamente mutagênica (**Fig. 2**) que resulta em substituições do tipo G → T. Alternativamente, a 8-oxoG pode emparelhar erroneamente com uma adenina, produzindo uma substituição do tipo A → T (revisado em David et al., 2007). Por outro lado, a Tg é considerada uma base pouco mutagênica (**Fig. 2**; frequência de mutação de 0,3% em células de mamíferos), causando mutações do tipo T → C. Contudo, a principal alteração causada pela Tg é a modificação da estrutura do DNA, o que leva a um bloqueio do processo de replicação. As lesões chamadas formamidopirimidinas são formadas pela abertura do anel imidazol das purinas e são consideradas as principais lesões produzidas por estresse oxidativo (Kamiya, 2003). Alguns exemplos de bases modificadas comumente encontradas na molécula de DNA, bem como, sua frequência de ocorrência estão representadas na **Figura 2**.

A via BER, que atua na reparação destas lesões, pode ser subdividida em cinco passos: (i) remoção da base danificada por ação de uma DNA-glicosilase, (ii) incisão no sítio abásico resultante (sítioapurínico-apirimidínico ou sítio AP) por uma AP-endonuclease, (iii) processamento das extremidades terminais, (iv) preenchimento do sítio AP e (v) reconstituição da fita danificada (Fortini et al., 2003).

Esta via de reparação inicia com a ação das DNA-glicosilases que reconhecem a base modificada e dão origem a uma quebra simples de DNA. A maioria das DNA-glicosilases atuam sobre um substrato específico, mas com preferência sobre derivados de purinas ou pirimidinas. Por exemplo, em mamíferos a NTH1 (homólogo de endonuclease III de *E. coli*) reconhece uma ampla variedade de pirimidinas oxidadas e seus derivados, como timina glicol (Tg), 5-hidroxicitosina-diidrouacil (DHU) e pelo menos seis outros tipos de pirimidinas oxidadas, enquanto que a OGG1 (DNA glicosilase de 8-oxoguanina) é responsável pela reparação de produtos derivados de guaninas, como 8-oxoG e formamidopirimidina-guanina (FapyG) (revisado em Hazra et al., 2007).

Quando as DNA-glicosilases são monofuncionais elas hidrolisam a ligação N-glicosídica para gerar sítios AP (Fortini e Dogliotti, 2007). Existem DNA-glicosilases (por exemplo, OGG1, NEL1, Ntg1, Ntg2) que possuem também ação de endonuclease (DNA-glicosilases/AP liases). Nesse caso, além da clivagem da ligação entre a desoxiribose e a base ocorre também um corte no lado 3' da lesão gerando uma quebra simples no DNA com uma extremidade 3'desoxiribose fosfato (3' dRP) e uma extremidade 5' fosfato terminal (5'P) (**Fig. 3A**). O papel das DNA-glicosilases/AP liases no reparo ocorre principalmente em células com deficiência na AP-endonuclease 1 (Apn1) (Boiteux e Guillet, 2004). Nestas células, a extremidade 3' precisa ser convertida em 3'OH para posterior polimerização ou ligação. Essa função é realizada pela ação de uma AP-endonucleases disponível na célula, APE1 (Wilson e Bohr, 2007) ou APE2 (Boiteux e Guillet, 2004).





**Figura 2. Frequência de ocorrência e potencial mutagênico de algumas bases danificadas no DNA** (adaptado de Wilson e Bohr, 2007).

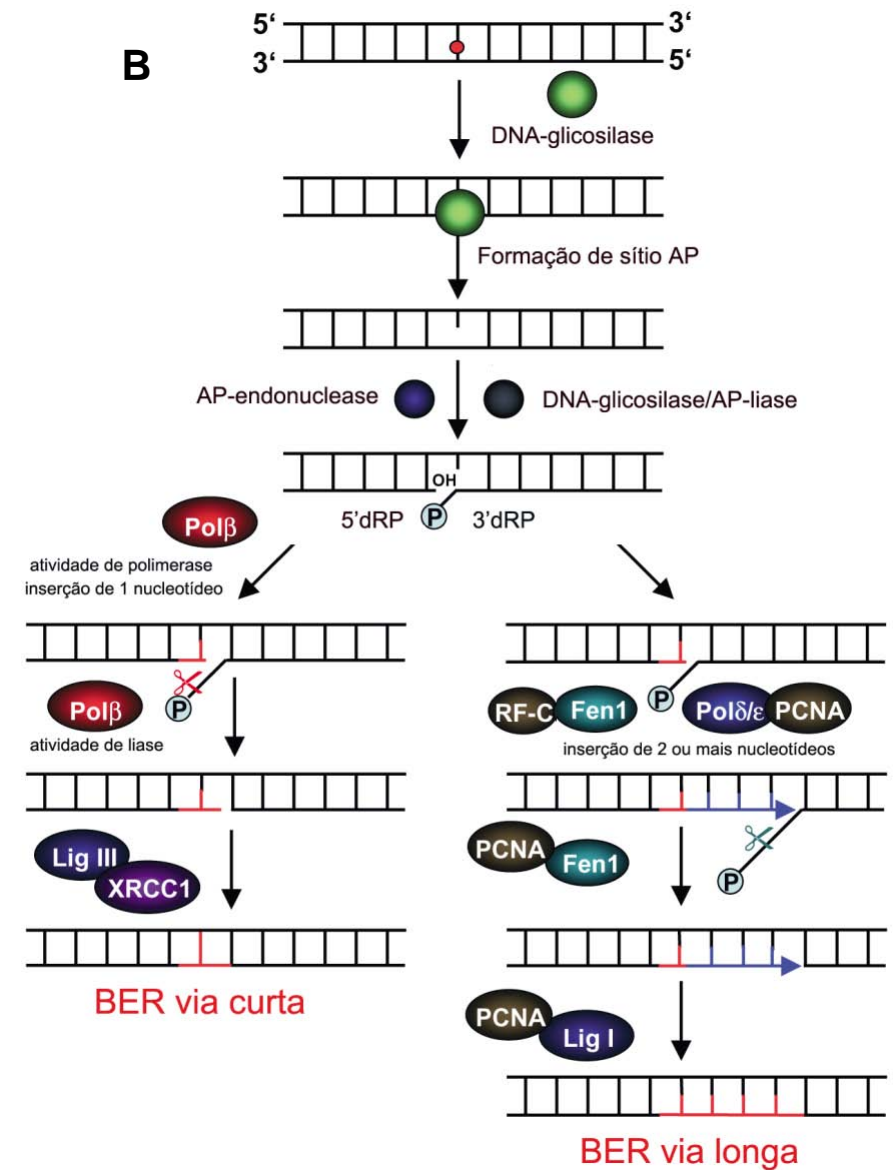
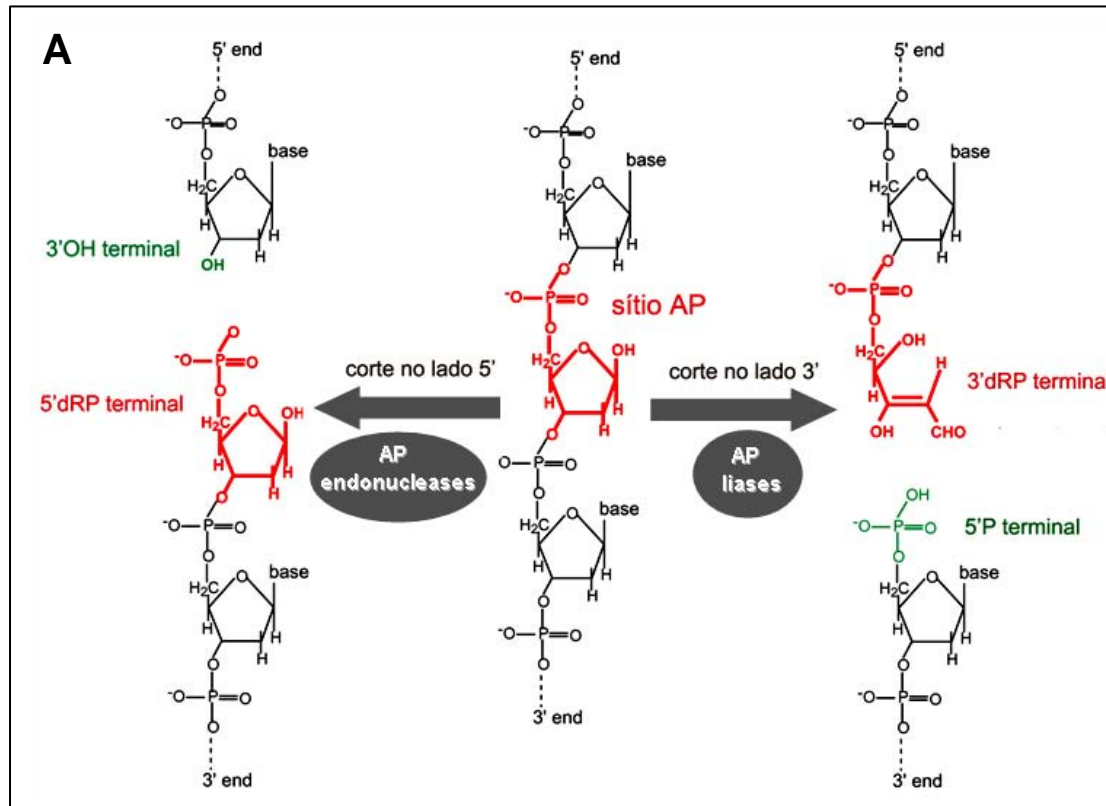
Uma quebra simples também pode ser gerada através da ação da AP-endonuclease (APE1 em humanos e Apn1 em *S. cerevisiae*), principal enzima que processa os sítios AP em eucariotos. As AP-endonucleases clivam o DNA no lado 5' do sítio AP, gerando um terminal 5'desoxiribose-fosfato (5'dRP) e uma extremidade 3'-hidroxila terminal (**Fig. 3A**; Boiteux e Guillet, 2004). Após, a extremidade 5'dRP é processada pela DNA polimerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ; BER via curta) ou pela 5'-flap endonuclease Fen1 (BER via longa) (**Fig. 3B**; Fortini et al., 2003).

As sub-vias do BER são diferenciadas pelo tamanho do fragmento a ser reconstituído e pelas enzimas envolvidas (**Fig. 3B**). O passo crítico na decisão pela via curta ou pela via longa é a remoção do 5'dRP pela Pol $\beta$ . A atividade de liase da

Pol $\beta$  ocorre somente sobre os resíduos dRP, sendo que os resíduos de aldeídos insaturados ou de fosfatos na posição 3' não são eliminados por esta enzima (revisado em Christmann et al., 2003).

A via curta promove a síntese de um único nucleotídeo no sítio da lesão pela ação da Pol  $\beta$ . A via longa envolve a ressíntese da fita de DNA através da inserção de um fragmento contendo de dois a sete nucleotídeos pelas polimerases de replicação Pol  $\delta/\epsilon$  com auxílio das proteínas PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), RFC (fator de replicação C) e FEN1 (flap endonuclease 1). Uma DNA-ligase completa a reparação do DNA através da ligação entre as fitas (**Fig. 3B**; Sweasy et al., 2006). A substituição da base danificada e a religação das fitas de DNA envolve a ação da poli(ADP)ribose polimerase (PARP). O papel de PARP no BER ainda não está totalmente esclarecido, contudo, acredita-se que PARP é capaz de proteger as extremidades cortadas contra a degradação de outras nucleases presentes na célula (Sharma e Dianov, 2007) e interagir com a DNA ligaseIII/XRCC1, bem como, com a DNA polimerase (Damia e D'Inclaci, 2007).

A reparação por excisão de bases é uma via conservada evolutivamente, sendo que as proteínas que realizam esta função estão presentes tanto em eucariotos superiores como inferiores. As proteínas requeridas para o BER e as principais diferenças deste sistema entre mamíferos e levedura estão detalhadas na **Tabela 1**.



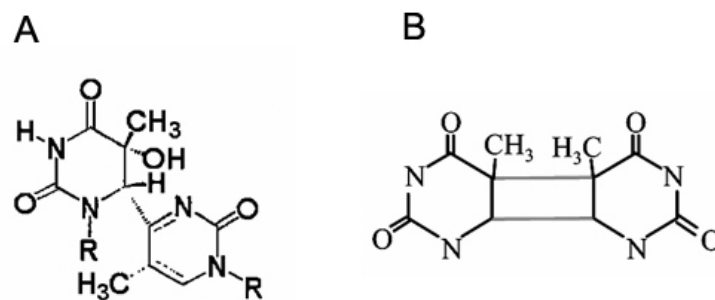
**Figura X. Estrutura dos sítios AP, quebras simples de DNA com extremidades 3' ou 5' bloqueadas e mecanismo de reparação por excisão de bases. A) No centro:** estrutura de um sítio AP no DNA. **Na esquerda:** SSB com extremidade 5' bloqueada por um 5' desoxiribosefosfato (5'dRP). **Na direita:** SSB com extremidade 3' bloqueada contendo um 3' aldeído insaturado ( $\alpha, \beta$ -4 hidroxí pentenal; 3'dRP). Embora as lesões aconteçam nas duas moléculas de DNA, apenas uma fita está representada (adaptado de Boiteux e Guillet, 2004). **B)** O reconhecimento da lesão ocorre por uma DNA-glicosilase específica que remove a base danificada através de hidrólise da ligação glicosídica. O sítio AP resultante é processado por uma AP-endonuclease. Dependendo da capacidade de clivagem da extremidade 5'dRP pela Pol $\beta$ , o reparo segue pela via curta ou pela via longa do BER (adaptado de Christmann et al., 2003).

**Tabela 1. Enzimas que atuam no BER no homem e em *Saccharomyces cerevisiae* e suas funções** (Dianov et al., 2003; Fortini et al., 2003; Kelley et al., 2003; Boiteux e Guillet, 2004).

Mamíferos (homem)	Levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	Funções	Ações / substratos
NTH1 (NTHL1)	Ntg1, Ntg2	DNA-glicosilase/ AP-liase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar podendo apresentar atividade de liase. Atua sobre uma variedade de lesões, como: timina glycol, 5-hidroxi- 6-hidroxi-diidrotimina (DHT) uracil glicol, 5-hidroxicitosina, 5-hidroxiuracil, uréia, FapyG, FapyA.
NEIL1, NEIL2	-	DNA-glicosilase/ AP-liase	Mesma função de NTH1. Em adição, reconhece 8-oxoG quando está pareada com A ou G.
UNG	Ung	DNA-glicosilase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar. Remove uracil, produto resultante da desaminação de C.
DUG	-	DNA-glicosilase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar. Remove uracil quando este está oposto a G e etenocitosina (formada em decorrência de peroxidação lipídica).
-	Mag1	DNA-glicosilase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar. Remove N3-metil A, N7-metil G, hipoxantina.
OGG1	Ogg1	DNA-glicosilase/ AP-liase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar podendo apresentar atividade de liase. Atua sobre lesões como: 8-oxoG:C, 8-oxoG:G, 8-oxoG:T, FapyG, FapyA.
MYH	-	DNA-glicosilase	Cliva a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar. Elimina adeninas incorporadas erroneamente em oposição a 8-oxoG.
MTH	-	Fosfatase	Converte 8-oxo-dGTP do <i>pool</i> de nucleotídeos para monofosfato prevenindo a incorporação de 8-oxo-dGTP.
APE1	Apn1	AP-endonuclease	Hidroliza a ligação fosfodiester na extremidade 5' da lesão. Atua principalmente sobre: sítios AP. Possui atividade de fosfodiesterase sobre 3' fosfato, 3' fosfoglicolato.
APE2	Apn2	AP-endonuclease	Apresenta atividade principalmente na ausência de Apn1. Atua sobre sítios AP, 3' fosfato, 3' fosfoglicolato.
Pol $\beta$	-	DNA-polimerase	Insere um nucleotídeo durante a síntese do reparo e excisa a extremidade 5'dRP após a incisão de APE1 (BER via curta)
Pol $\epsilon$ / $\delta$	Pol 2 (Pol $\epsilon$ )	DNA-polimerase	Insere um fragmento de nucleotídeos durante a síntese do reparo (BER via longa em mamíferos e ambas as subvias em levedura)
LIGI	Cdc9	DNA-ligase	Faz a religação das extremidades de DNA (BER via longa em mamíferos e ambas as subvias em levedura).
LIGIII / XRCC1	XRCC1	DNA-ligase	Faz a religação das extremidades de DNA (BER via curta). Embora XRCC1 exista em levedura, ainda não foi evidenciado seu papel no BER.
PCNA	PCNA	Fator auxiliar para polimerase	Requerido para a síntese de DNA pelas Pol $\epsilon$ / $\delta$ .
FEN1	Rad27	Flap-endonuclease	Remove resíduos da extremidade 5', como 5'dRP.
MUS81-MMS4	Mus81-Mms4	Flap-endonuclease	Processa extremidades finais 3' bloqueadas, como 3'dRP.

## 1.2.2 Reparação por excisão de nucleotídeos

O NER é considerado o mais flexível de todos os mecanismos de reparação devido a sua capacidade de eliminar uma variedade de lesões que distorcem a hélice e provocam mudança na estrutura química do DNA. Os mais relevantes substratos para o NER são os dímeros de pirimidina ciclobutanos (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 (6-4PPs; **Fig. 4**). Ambos são formados entre pirimidinas adjacentes e constituem as duas maiores classes de lesões induzidas pela luz solar UV. Outros substratos para o NER são as lesões que modificam a estrutura do DNA causadas pelos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (presentes na fumaça do cigarro) e as lesões formadas por ligações cruzadas (*interstrand crosslinks*, ICL) induzidas por agentes quimioterapêuticos (revisado em de Boer e Hoeijmakers, 2000). Além disso, o NER também atua na reparação de lesões de bases, como a 8-oxoG (Gallego e Sarasin, 2003), sendo considerado nesse caso um sistema *back-up* para o BER (de Boer e Hoeijmakers, 2000).



**Figura 4. Lesões que distorcem a hélice do DNA: A) fotoproducto 6-4 (PP 6-4) e B) dímero de pirimidina ciclobutano (CPD)** (adaptado de Slupphaug et al., 2003).

O sistema NER envolve cerca de 20 a 30 proteínas que atuam em passos sucessivos desde o reconhecimento do dano, modificação da estrutura da cromatina com abertura da hélice e incisão em ambos os lados da lesão. Após a excisão do

oligonucleotídeo contendo o dano, o intervalo é preenchido através da síntese de DNA, seguido da ligação entre as extremidades (revisado em Hoeijmakers, 2001b).

A via NER repara preferencialmente os genes que estão sendo transcritos, isto é, a reparação de uma lesão que bloqueia a transcrição e inibe a produção de um RNA e da proteína é realizada com maior eficiência e mais rapidamente comparada com outras partes do genoma que não estão sendo usadas pela célula.

Em vista disto, o NER é subdividido em duas vias: NER acoplado a transcrição (TC-NER; *transcription-coupled NER*) e NER do genoma global (GGR; *global genome repair*). Ambos os processos empregam exatamente as mesmas enzimas, exceto durante o reconhecimento inicial do dano (**Fig. 5**).

O complexo XPC-HR23B juntamente com XPE (DDB2) do GG-NER atuam basicamente no reconhecimento de bases mal pareadas mas não de outros tipos de lesões. Isto explicaria por que lesões como CPDs são pobremente reparadas pelo GG-NER. No caso do TC-NER, a RNA polimerase de elongação é responsável pela detecção do dano. Após, a polimerase bloqueada deve ser deslocada para facilitar o acesso para as enzimas de reparação. Este processo requer a participação de dois fatores específicos, CSA e CSB.

Nas duas subvias, os estágios subsequentes envolvem a participação das helicases XPB e XPD (componentes do complexo de transcrição TFIIH) que promovem a abertura da hélice a cerca de 30 pares de bases ao redor do dano. Além do fator TFIIH, diversas outras proteínas acessórias estão envolvidas na via NER. XPA provavelmente confirma a presença do dano por detectar anormalidades na estrutura da dupla hélice, enquanto que RPA (fator de replicação A) estabiliza a abertura intermediária da hélice através da ligação na fita não danificada.

As endonucleases do NER, XPG e XPF/ERCC1 clivam o DNA no lado 3' e 5' da lesão, respectivamente, gerando um oligonucleotídeo de 24 a 32 bases contendo o dano. Duas DNA polimerases estão implicadas na síntese do novo fragmento de DNA, Pol $\gamma$  e Pol $\epsilon$ . Além disso, PCNA e RFC são requeridos para completar a síntese. Finalmente, o último passo do NER é a ligação da extremidade 5' do DNA ao novo fragmento sintetizado através da DNA ligase I (revisado em Costa et al., 2003).

No total, 25 ou mais proteínas participam no NER. Estudo *in vitro* indicam que a maquinaria do NER se organiza passo a passo a partir de componentes individuais e que após um único evento de reparação o complexo se desorganiza novamente (Hoeijmakers, 2001b). A ordem precisa de atuação dos fatores do NER é ainda objetivo de muitas pesquisas e acredita-se que esta ordem não necessariamente seja invariável em todas as condições (Cleaver, 2005).

O impacto biológico do NER está relacionado a três doenças genéticas humanas raras, mas severas, que são resultado de defeitos nesta via de reparação: *xeroderma pigmentosum* (XP), síndrome de *Cockayne* (CS) e tricotiodistrofia (TTD). Pacientes XP apresentam determinadas características clínicas como extrema sensibilidade a luz solar, mudanças na coloração e perda da elasticidade da pele, bem como, fotofobia e desenvolvimento de múltiplos cânceres de pele, incluindo carcinomas e melanomas. Além disso, os pacientes apresentam anormalidades neurológicas resultado de progressiva morte neuronal (revisado em Lehmann, 2003). A deficiência de oito genes já foram identificados nos pacientes XP: sete deles envolvidos no NER (XPA a XPG) e uma variante XP (XPV; Pol $\eta$ ) que apresenta função de polimerase translesão. A maioria dos pacientes XP apresentam defeitos em ambas as vias, TC-NER e GGR, onde um componente comum nas vias é

afetado. Apenas uma forma de XP afeta somente o GGR, nesse caso os pacientes ainda apresentam capacidade de reparação do DNA de fitas transcritas (revisado em Hoeijmakers, 2001a).

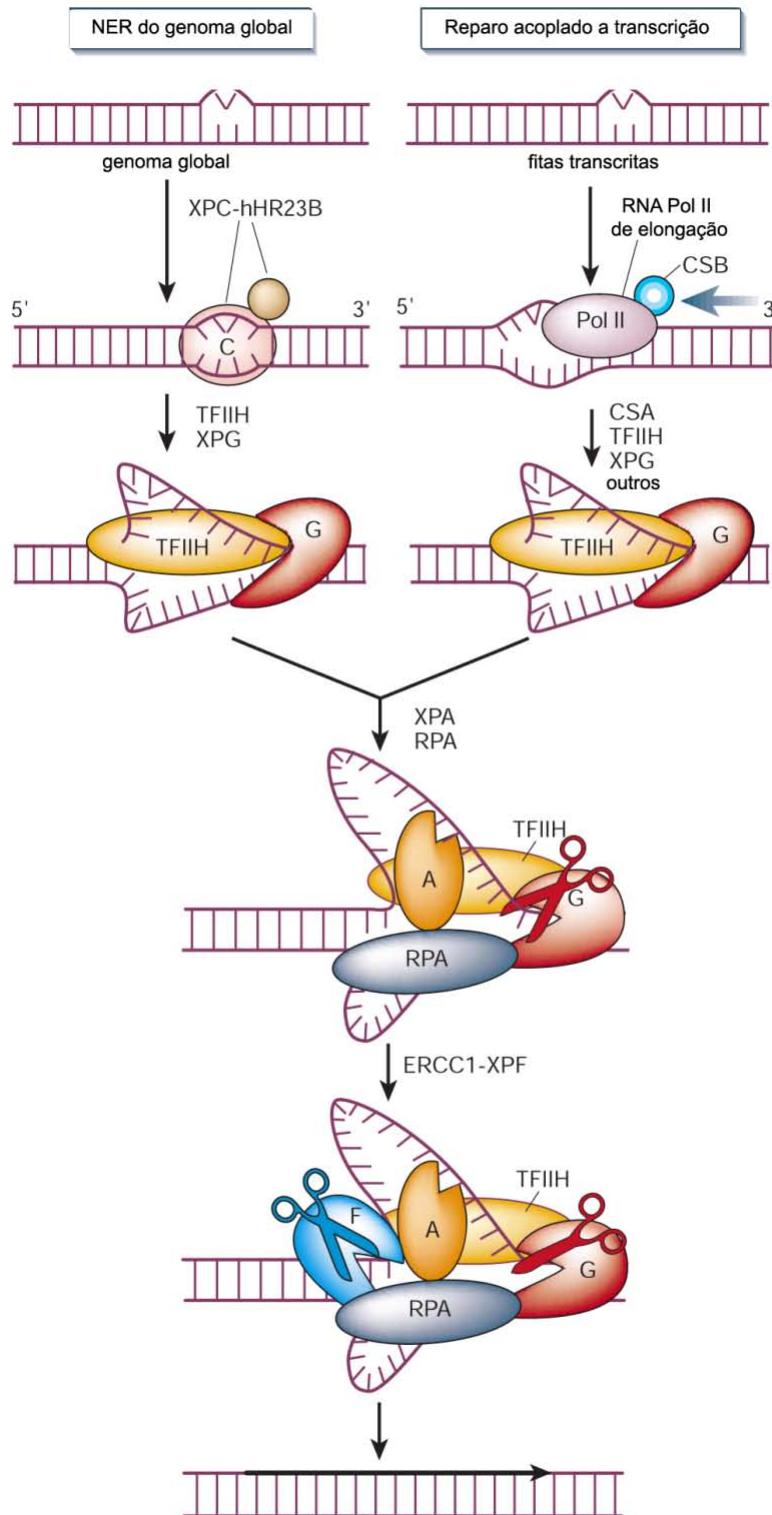
Os pacientes portadores da síndrome CS apresentam diversos defeitos no desenvolvimento, incluindo severos defeitos físicos e retardo mental. A sensibilidade a luz solar manifesta-se através de erupção na pele mas sem modificações na pigmentação e, ao contrário dos pacientes XP (que apresentam aumento de 1000 vezes no risco de desenvolvimento de câncer), os pacientes CS não apresentam risco aumentado para desenvolvimento de câncer (Lehmann, 2003; Kraemer et al., 2007). Defeitos em cinco genes levam ao aparecimento da síndrome de *Cockayne*: CSA, CSB, XPB, XPD e XPG (Hoeijmakers, 2001a). Para as deficiências nos três últimos genes, o fenótipo CS é também associado as manifestações XP (Sarasin e Stary, 2007). Cerca de 20 pacientes no mundo todo já foram descritos por apresentarem ambos os sintomas de XP e CS (XP/CS). Investigações genéticas nesses pacientes não revelaram mutações nos genes CSA ou CSB, mas apenas defeitos em um dos genes XP (XPB, XPD ou XPG). Isto indica que determinadas mutações em genes XP conduzem a síndrome CS, sugerindo que estes pacientes apresentavam pelo menos duas funções afetadas no gene XP, uma envolvendo o NER e outra envolvendo o TC-NER (revisado em Leibel et al., 2006).

TTD é uma síndrome que apresenta diversos sintomas em comum com CS, porém estes pacientes apresentam cabelos e unhas muito frágeis, característica não encontrada em pacientes XP ou CS (Hoeijmakers, 2001b; Cleaver, 2005). Pacientes TTD apresentam mutações nos genes XPD ou XPB, resultando em redução da atividade do TFIIH, causada por mutações que desestabilizam a estrutura deste fator de transcrição. Os níveis reduzidos de TFIIH são insuficientes para promover



atividade de transcrição adequada, resultando em deficiência de proteínas ricas em cisteína o que torna os cabelos quebradiços (Lehamnn, 2003).

Estudos genéticos e bioquímicos do NER realizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm contribuído para elucidar o mecanismo de incisão dual realizado pelo sistema NER em eucariotos, bem como, esclarecido a função de diversas proteínas envolvidas neste sistema. Na levedura *S. cerevisiae* as diversas proteínas do NER existem in vivo como subunidades multiprotéicas chamadas de fatores de reparação por excisão de nucleotídeos (NEF). Rad14 e Rad1-Rad10 formam uma subunidade chamada NEF1, o complexo Rad4-Rad23 forma o chamado NEF2, Rad2 e TFIIH constituem o NEF3, enquanto que o NEF4 é formado pelo complexo Rad7-Rad16 (Prakash e Prakash, 2000). A **Tabela 2** apresenta as proteínas homólogas do NER em humanos e em *S. cerevisiae* com suas respectivas funções bioquímicas.



**Figura 5. Modelo para o mecanismo do NER do genoma global (GG-NER) e para o NER acoplado a transcrição (TC-NER).** O complexo XPC-hHR23B reconhece o dano durante o GG-NER (esquerda), enquanto que o bloqueio da RNA polimerase II é o passo chave no reconhecimento do dano durante o TC-NER (direita). Os estágios seguintes são catalizados pelas mesmas enzimas em ambas as sub-vias (adaptado de Hoeijmakers, 2001b). Abreviações: G: XPG, A: XPA.

**Tabela 2. As funções de proteínas envolvidas no NER em *Saccharomyces cerevisiae* e em humanos (de Laat et al., 1999; Prakash e Prakash, 2000).**

	Mamíferos (homem)	Levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	Funções
	XPA	Rad14	Facilita o acesso para os complexos de reparação através da ligação a fita de DNA danificada
	XPC HR23B	Rad4 Rad23	Sensor de danos e responsável por recrutar outros fatores de reparo durante o GG-NER
	XPE (DDB)	-	Auxilia no reconhecimento do dano no DNA
	XPB (ERCC3) XPD (ERCC2) P44	Rad25 Rad3 SSL1	DNA helicase 3' → 5' DNA helicase 5' → 3'
TFIIH	P62 P52 MAT1	TFB1 TFB2 TFB3	Complexo que cataliza a abertura da cromatina em torno da lesão, facilitando o acesso para as proteínas de reparação
	XPF (ERCC4) ERCC1	Rad1 Rad10	Complexo Rad1-Rad10 nuclease corta o DNA no lado 5' da lesão
	XPG (ERCC5)	Rad2	Endonuclease que corta o DNA no lado 3' da lesão
	CSA (ERCC8) CSB (ERCC6)	Rad28 Rad26	Facilitam o acesso das proteínas de reparação através de interação com a RNA Pol II
	-	MMS19	Modula a atividade do TFIIH
	-	Rad16	Formam o complexo NEF4 que auxilia no reconhecimento do dano através do deslocamento sobre a molécula de DNA
	-	Rad7	utilizando energia derivada da hidrólise do ATP

### 1.2.3 Reparação de DSBs: recombinação homóloga e reparação não-homóloga

A maioria do conhecimento sobre os processos envolvidos nas vias de reparação de quebras duplas resultou de estudos realizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes mecanismos são altamente conservados através da evolução fazendo com que possam ser aplicados a outros organismos eucarióticos (Aylon e Kupiec, 2004). Uma tabela comparativa das proteínas envolvidas na reparação de DSBs em humanos e em *S. cerevisiae* pode ser vista no final desta seção (**Tab.3**).

As quebras duplas são consideradas os danos mais perigosos para o DNA devido a serem potentes indutores de efeitos genotóxicos e morte celular. DSBs podem ser geradas no DNA como consequência de exposição a raios X, agentes químicos, radicais livres ou durante a replicação de uma quebra simples gerada como resultado do bloqueio da forquilha de replicação (Krogh e Symington, 2004). Além disso, as DSBs são geradas propositalmente durante a recombinação meiótica (Pâques e Haber, 1999).

Atualmente, as pesquisas sobre a geração e reparação de quebras duplas no DNA consideram as alterações da cromatina, eventos que podem ocorrer com o objetivo de facilitar a reparação do DNA (Downs et al., 2007). Sabe-se que após a introdução de uma DSB no DNA ocorrem modificações nas histonas e alteração da estrutura da cromatina (Foster e Downs, 2005). As histonas são fortemente modificadas por alterações pós-traducionais que podem modificar a sua carga e afetar a capacidade de condensar o DNA ou, podem criar ou remover ligações de outras proteínas na cromatina (Peterson e Laniel, 2004). Desde a descoberta que a indução de quebras duplas no DNA é seguida de fosforilação da histona H2A(X), a identificação da presença desta histona modificada (chamada de gamma-H2AX em células de mamíferos ou gamma-H2A na levedura) vem sendo extensivamente usada como um marcador de DSBs no DNA (Bekker-Jensen et al., 2006; Rodrigue et al., 2006; Wykes et al., 2006). Em mamíferos, as proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada) e ATR (ataxia telangiectasia-related) e seus homólogos Tel1 e Mec1 em *Saccharomyces cerevisiae*, são os principais responsáveis por fosforilar H2A(X) e retardar a progressão do ciclo celular a fim de promover a reparação de DSBs (Morrison e Shen, 2005).

Nos organismos eucarióticos existem dois sistemas principais para reparação DSBs: recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*) e reparação não-homóloga (NHEJ, *non-homologous end-joining*) que são vias consideradas livre de erro e indutora de erro, respectivamente. Em eucariotos simples, como a levedura *S. cerevisiae*, HR é a principal via de reparação enquanto que em mamíferos predomina a via NHEJ. A ativação das vias HR ou NHEJ depende da fase do ciclo celular em que a célula se encontra. NHEJ ocorre principalmente durante as fases G0 e G1 enquanto que HR repara DSBs durante as fases S e G2 (revisado em Christmann et al., 2003).

### ***Recombinação homóloga***

Durante a via HR, uma DSB é reparada usando as informações contidas na cromátide irmã não danificada como modelo. A recombinação homóloga em eucariotos é realizada através de proteínas do grupo de epistasia RAD52, que foi originalmente identificado através de análises genéticas em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis a radiação. Em células humanas, este grupo inclui proteínas do complexo M/R/N (MRE11/RAD50/NBS1), RAD51, os parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3), RAD54 e RAD54B. Os produtos dos genes BRCA1 e BRCA2, envolvidos na suscetibilidade ao câncer de mama, são também envolvidos na modulação da recombinação homóloga (revisado em Agarwal et al., 2006).

No momento em que uma DSB é detectada a resposta inicial é mediada pelo complexo M/R/N e pela proteína ATM. O primeiro passo é a ressecção das extremidades finais de DNA para gerar extremidades invasivas do tipo 3' fita simples (*single strand DNA*; ssDNA) que são substratos para a recombinação homóloga

(**Fig.6A**). Uma vez que as extremidades 3' estão disponíveis, a proteína RAD51, que interage com RAD52 e tem auxílio dos mediadores RAD54 e RPA, liga-se a estas e inicia a invasão em direção a fita homóloga (**Fig.6A**; Agarwal et al., 2006). Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de invasão das extremidades de DNA em direção a fita homóloga, sendo que os modelos mais consistentes são o anelamento simples de fita (*single-strand annealing*), a síntese dependente de anelamento de fita (*synthesis-dependent strand annealing* ou SDSA) e o reparo de quebras duplas (*double strand breaks repair* ou DSBR). O reparo de quebras duplas, abordado nesta tese, é o principal evento que ocorre nas células durante a reparação por recombinação (revisado em Krogh e Symington, 2004; Helleday et al., 2007).

Após a invasão das extremidades, o sistema necessita da função da uma DNA polimerase (Pol $\eta$ ) que copia a informação da fita intacta (Krogh e Symington, 2004; Rattray e Strathern, 2005). Terminada a extensão, as extremidades são novamente reunidas pela ação da DNA polimerase I. Entretanto, antes do reparo estar completo, endonucleases específicas vão atuar na resolução das junções de Holliday. Embora seja conhecido que XRCC3 e RAD51C estão associadas nesta atividade, a explicação deste mecanismo ainda não está completa (Brugmans et al., 2007).

Em humanos, duas anormalidades são conhecidas por defeitos na via de recombinação homóloga, a anemia de Fanconi e a síndrome de Bloom. A anemia de Fanconi é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada por instabilidade cromossômica e predisposição ao câncer, incluindo leucemias mielóides e carcinomas de cabeça e pescoço e do sistema ginecológico (Wang e D'Andrea, 2004). Nos pacientes portadores da síndrome de Bloom a instabilidade

cromossômica gera alta propensão a desenvolver diferentes tipos de tumores (Amor-Guéret, 2006).

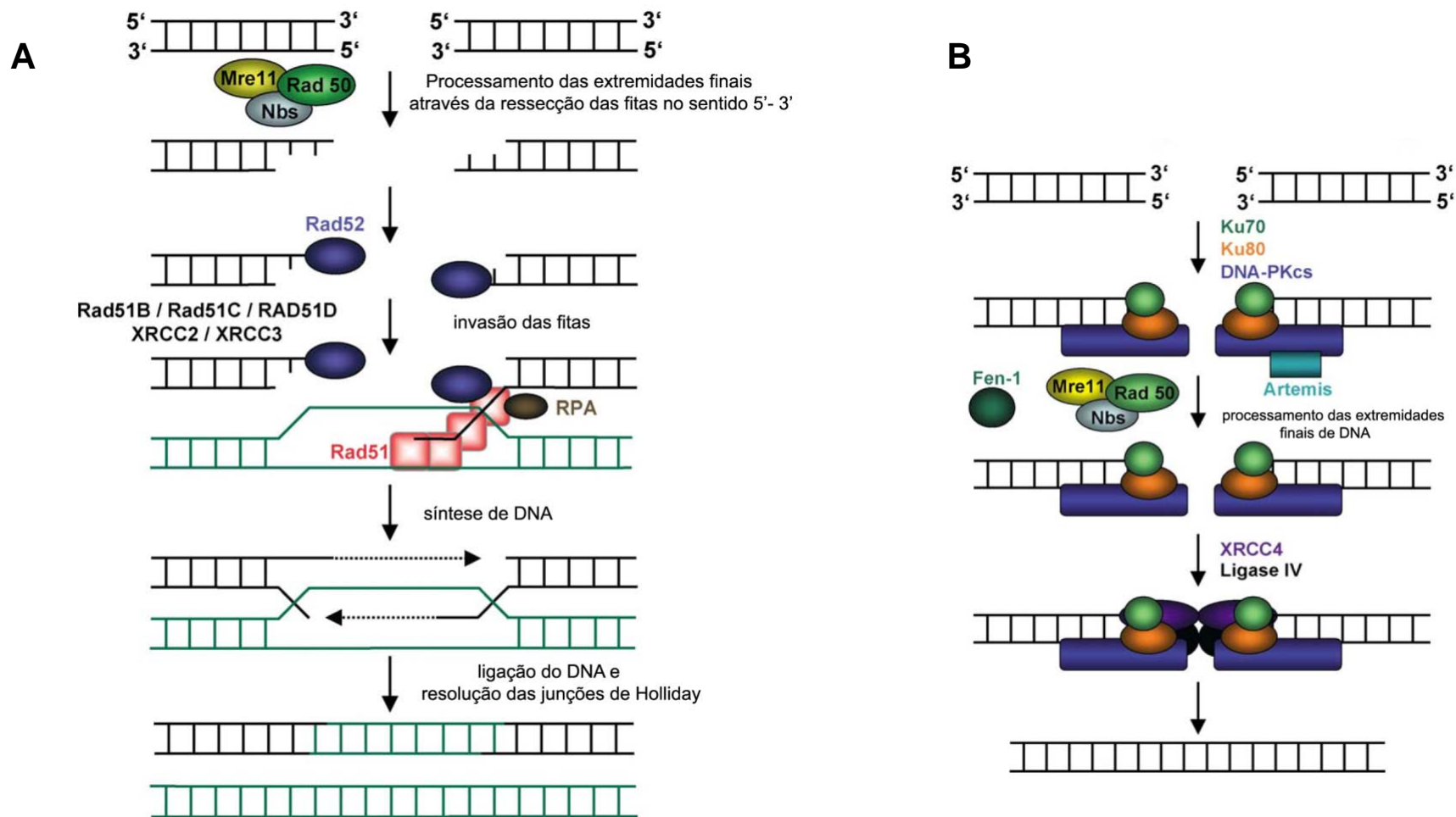
### **Reparação não-homóloga**

O sistema NHEJ repara o DNA através da religação de duas extremidades finais de uma quebra dupla, sem necessitar da presença de uma sequência homóloga (**Fig.6B**). O primeiro passo do NHEJ é a ligação de um complexo heterodimérico, consistindo das proteínas Ku70 e Ku80 (XRCC5), às extremidades finais da DSB com o objetivo de proteger o DNA da digestão por exonucleases (Burma et al., 2006). Após a ligação, o heterodímero Ku associa-se com a subunidade catalítica da proteína DNA-PK (XRCC7 ou DNA-PKcs). Este complexo, juntamente com as extremidades do DNA, é chamado sinapse. O complexo sináptico estimula a atividade de quinase da DNA-PKcs que fosforila proteínas requeridas para a continuidade do processo (Budman et al., 2007). Em seguida, diferentes endonucleases são recrutadas para modificar as extremidades de DNA, destacando-se o complexo M/R/N, a flap endonuclease 1 (FEN1) e a proteína Artemis (Pso2p/Snm1p) (Christmann et al., 2003). As extremidades modificadas servem como substrato para o complexo formado pelas enzimas XRCC4 e DNA ligase IV que restauram a fita de DNA (Agarwal et al., 2006).

Ao contrário da reparação de DSBs de origem patológica, o sistema NHEJ é também essencial para o processamento de DSBs programadas em linfócitos. A diversidade das imunoglobulinas e dos receptores das células T e B é gerada através da formação de DSBs que ocorrem em sítios específicos, chamados de sequências sinalizadoras de recombinação. Estas sequências são formadas por um arranjo de genes formados por três segmentos separados, denominados variável

[(V) *variable*], diversidade [(D) *diversity*] e ligação [(J) *joining*]. Cada uma das sequências é ligada através do NHEJ, o que completa a recombinação V(D)J e garante a produção de imunoglobulinas funcionais e a diversidade imunológica (Lees-Miller e Meek, 2003; Agarwal et al., 2006).





**Figura 6. Mecanismos de reparação de quebras duplas. A) Recombinação homóloga (HR).** A HR começa com a ressecção nucleolítica das extremidades finais da quebra dupla na direção 5' → 3' pela ação do complexo MRN formando um fragmento de DNA livre na extremidade 3'. A proteína Rad52 liga-se a extremidade 3' para proteger contra a digestão nucleolítica. Rad52 interage com Rad51 e com as proteínas acessórias provocando a invasão em direção a fita homóloga não-danificada. Depois da síntese de DNA, a estrutura de Holliday é resolvida completando a reparação. **B) Reparação não-homóloga (NHEJ).** O reconhecimento e a ligação do dano ocorre através do complexo Ku70/Ku80. Em seguida, o complexo Ku se liga a DNA-PKcs (subunidade catalítica da DNA-PK) formando a holoenzima DNA-PK. A DNA-PK ativa XRCC4-Ligase IV que une as extremidades da quebra dupla. Antes da religação pela XRCC4-Ligase IV, as extremidades finais são processadas pelo complexo MRE11/RAD50/NBS1 envolvendo também as proteínas FEN1 e Artemis (adaptado de Christmann et al., 2003).

**Tabela 3. As funções das proteínas envolvidas na reparação de quebras duplas de DNA em humanos e em *Saccharomyces cerevisiae* (Aylon e Kupiec, 2004; Daley et al., 2005; Burma et al., 2006).**

	Mamíferos (homem)	Levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	Funções
<b>Recombinação homóloga</b>	RAD51	Rad51	Liga-se as extremidades ssDNA para formar um nucleofilamento e promover a invasão da fita em direção a fita homóloga.
	RAD51B	-	
	RAD51C	-	
	RAD51D	-	
	RPA	RPA	Fator auxiliar para RAD51.
	DMC1	Dmc1	Liga-se a RAD51 formando o complexo de invasão.
	XRCC2	-	
	XRCC3	-	
	RAD52	Rad52	Liga-se a RAD51 e RPA.
	RAD54L	Rad54	Membro da família Swi2/Snf2 de proteínas que atuam na remodelagem de cromatina. Requerida para as reações de invasão das fitas.
	RAD54B	-	
	-	Rad55	
	-	Rad57	Fatores acessórios para a ação invasiva de RAD51.
	-	Rad59	
	-	Rhc18	
	BRCA1	-	Interagem com a proteína RAD51 e com o complexo M/R/N(X).
	BRCA2 (FANCB, FANCD1)	-	
	Pol $\eta$	-	Polimerase translesão envolvida na extensão do fragmento de DNA.
MUS81	-	Envolvida na resolução das junções de Holliday.	
RAD50	Rad50		
MRE11A	Mre11 (Rad58)	Complexo (M/R/N em humanos e M/R/X na levedura) responsável pela ressecção das extremidades da quebra dupla para gerar 3'ssDNA.	
NBS1	Xrs2		
<b>Reparação não-homóloga</b>	Ku70 (G22P1)	Yku70 (Hdf1)	Primeiras proteínas a se ligar nas extremidades finais de DNA. Recruta DNA-PKcs.
	Ku80 (XRCC5)	Yku80 (Hdf2)	
	DNA-PKcs / XRCC7	-	Fosforila outras proteínas, bem como, a si própria. Facilita a ligação entre as extremidades finais.
	LIG4	Lig4 (Dnl4)	Complexo responsável pela ligação entre as extremidades de DNA.
	XRCC4	Lif1	
	-	Nej1	Função ainda não esclarecida. Pode ser responsável por recrutar Dnl4/Lif1 para o núcleo.
	Artemis	Pso2/Snm1*	Fator acessório no processamento das extremidades finais. Sofre fosforilação pela DNA-PKcs. * Embora seja o homólogo de Artemis em levedura parece estar envolvido apenas no reparo de <i>crosslinks</i> e estruturas <i>harpins</i> .

#### 1.2.4 Síntese de DNA Translesão (TLS)

Muitos dos danos presentes no DNA não são reconhecidos e não podem ser acomodados no interior do sítio ativo das DNA polimerases replicativas, resultando em um bloqueio do progresso da maquinaria de replicação (Lehmann et al., 2007).

As células dispõem de um importante mecanismo para promover a passagem através destes danos. Este mecanismo envolve a atividade de DNA polimerases especializadas capazes de sintetizar o DNA através da lesão. A maioria destas polimerases pertencem a família Y e, ao contrário das polimerases replicativas, elas operam em baixa velocidade e com baixa fidelidade. Contudo, seus sítios ativos são mais flexíveis e capazes de adotar diferentes conformações quando encontram bases alteradas no DNA. Existem duas DNA polimerases Y em *Saccharomyces cerevisiae* (Pol $\eta$ [Rad30] e Rev1) e quatro em mamíferos (Pol $\eta$ [Rad30], Pol $\kappa$ , Pol $\iota$  e Rev1). Além disso, a DNA polimerase  $\zeta$  (Rev3) da família B também apresenta importante papel no TLS de eucariotos (Lehmann, 2006).

Pol $\eta$ (Rad30) foi descoberta em células de mamíferos como uma proteína deficiente numa das variantes da doença XP. *In vitro*, Pol $\eta$  é capaz de replicar o DNA através de lesões CPDs, e na maioria das vezes, inserir bases corretas no local. Esta variante XP apresenta elevada frequência de mutação, indicando que nas células normais Pol $\eta$  é responsável pela manutenção de baixos níveis de mutações durante a exposição à radiação UV. Na sua ausência, o TLS é acionado por uma ou várias outras polimerases que podem agir em combinação. Estas polimerases são menos efetivas e resultam no aumento da indução de mutações, fenótipo observado na desordem XP (**Fig.7A**; Lehmann et al., 2007).

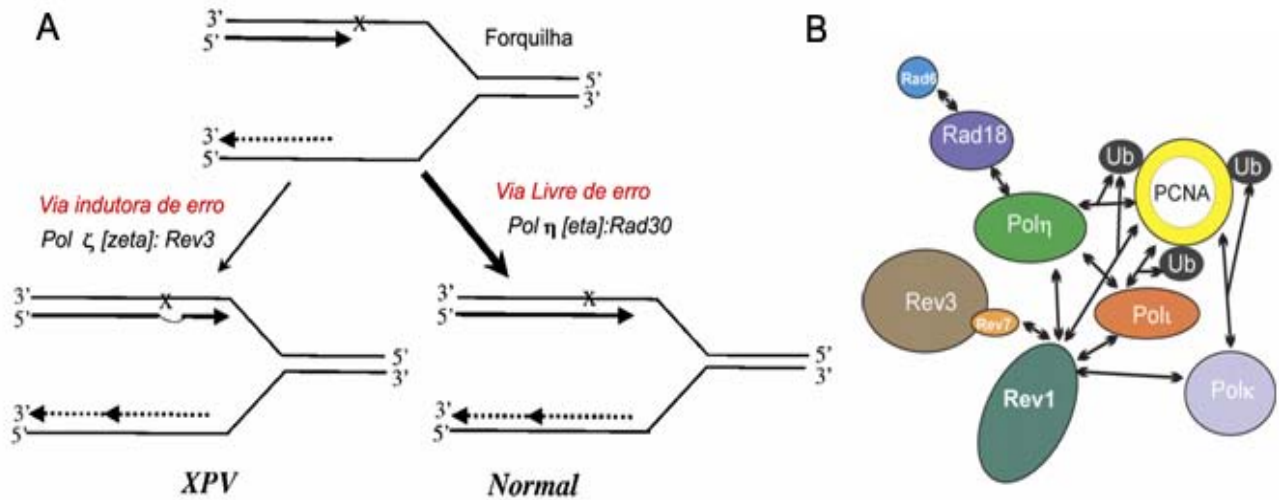
Outros tipos de lesões, como o fotoproduto 6-4 não permitem a ação da Pol $\eta$ . Estudos em levedura e em células de mamífero indicam que Pol $\zeta$  e Rev1 são requeridas para promover a síntese translesão (Lehmann, 2006).

Pol $\zeta$  é um heterodímero composto pela subunidade catalítica Rev3 e pela subunidade regulatória Rev7. Rev1, Rev3 e Rev7 foram primeiramente identificadas em *S. cerevisiae* e são encontradas também em mamíferos. Estas proteínas estão implicadas na inserção de bases erradas durante a replicação. Sabe-se que a atividade catalítica de Rev1 não é requerida para a mutagênese induzida pelo UV, portanto está envolvida no TLS de outras lesões. As propriedades de Rev1, Rev3 e Rev7 são idênticas na maioria dos casos, sugerindo que Pol $\zeta$  e Rev1 agem em conjunto (Prakash et al., 2005).

Após o bloqueio da forquilha de replicação pela presença de um dano, as polimerases são recrutadas. O evento inicial para a ativação da síntese translesão é a ubiquitinação de PCNA na lisina 164. A mono-ubiquitinação de PCNA ocorre pela ação das enzimas Rad6 (ubiquitina conjugada E2) e Rad18 (ubiquitina ligase). Embora o mecanismo de indução do TLS ainda não esteja totalmente explicado, acredita-se que a mono-ubiquitinação canaliza o reparo através de uma via TLS indutora de erro, enquanto que a poli-ubiquitinação induz uma via livre de erro. Além disso, sabe-se que a exposição do DNA de mamíferos a agentes causadores de dano e a ativação do TLS resultam de ambos eventos: ativação de proteínas que induzem a ubiquitinação de PCNA (Rad6 e Rad18) e degradação da proteína USP1, responsável pela desubiquitinação (Lehmann, 2006).

Como pode ser observado na **Figura 7B**, as polimerases são recrutadas após a bloqueio da forquilha de replicação e os eventos seguintes dependem da

modificação de PCNA e da interação entre as diferentes polimerases e PCNA ubiquitinado.



**Figura 7. O mecanismo de síntese de DNA translesão. A)** Modelo para as vias TLS livre de erro e indutora de erro. **B)** A interação entre as diferentes proteínas envolvidas no TLS (adaptado de Carty et al., 2003; Lehmann et al., 2007).

### 1.3 A ECTEINASCIDINA 743

O desenvolvimento da ecteinascidina 743 (ET-743) vem sendo realizado pela indústria farmacêutica *PharmaMar* (Espanha) em parceria com a *Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development* (Estados Unidos) pelo nome comercial de *Yondelis™* e nome genérico *trabectedin*. Recentemente, a ET-743 recebeu a designação de *Orphan drug* pela *European Commission* (EC) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) para STSs e câncer de ovário (Newman e Cragg, 2004; Simmons et al., 2005). Embora a ET-743 ainda não esteja no mercado mundial, recebeu opinião positiva da *European Medicines Agency* (EMA) e sua comercialização foi autorizada para o tratamento de sarcomas de tecidos moles (*Soft Tissue Sarcomas*; STSs) na União Européia (*PharmaMar website*).

#### 1.3.1 A descoberta dos extratos de *Ecteinascidia turbinata*

A ET-743 (**Fig.8B**) foi isolada de extratos de *Ecteinascidia turbinata* (**Fig.8A**), um tunicado encontrado no mar do Caribe (Sigel et al., 1970; Rinehart e Holt, 1992, Rinehart et al., 1990a). Acredita-se que os compostos ativos deste tunicado são metabólitos secundários resultantes da simbiose bacteriana, como ocorre em outras ascídias e esponjas (Piel, 2004).

Os extratos etanólicos de *Ecteinascidia turbinata* foram primeiramente estudados por Sigel em 1969, que identificou sua atividade antitumoral *in vitro* (Sigel et al., 1970). Após esse período, o mesmo grupo de pesquisa evidenciou atividades antimitogênica e imunossupressora dos extratos em linfócitos humanos normais (Lichter et al., 1975). Além disso, o tratamento fibroblastos humanos com o extrato de *E. Turbinata* resultou na redução da síntese e interferência com a reparação do

DNA. O efeito sobre a síntese foi avaliado através da inibição da incorporação de bromouridina e a acumulação de quebras simples foi determinada pelo método que utiliza um gradiente alcalino de sacarose após irradiação das células com luz ultravioleta (Dunn et al., 1982).

Na década de 80, Sasaki e colaboradores evidenciaram a atividade antitumoral de frações dos extratos aquosos de *E. turbinata* contra sarcomas sólidos de ratos. As taxas de inibição do crescimento dos sarcomas foram altas, chegando a cerca de 60% (Sasaki et al., 1985).

Embora a atividade citotóxica dos extratos tenha sido estudada na década de 60 (Sigel et al., 1970) o isolamento das substâncias ativas e a identificação da estrutura não ocorreu até 1986 (Wright et al., 1990).

### **1.3.2 Estudos químicos**

Após uma expedição realizada em 1978 (*Alpha Helix Caribbean Expedition*), realizada pelo grupo liderado por Rinehart (Rinehart et al., 1990b), diversos outros grupos concentraram seus esforços na identificação das substâncias ativas contidas no extrato (Wright et al., 1990).

Em 1986, as substâncias ativas foram isoladas por cromatografia de fase reversa e as estruturas foram determinadas através de métodos espectroscópicos (Wright et al., 1990; Sakai et al., 1992; Sakai et al., 1996). Primeiramente, as estruturas químicas dos compostos foram elucidadas por métodos que combinam NMR (*nuclear magnetic resonance*) e FABMS (*fast atom bombardment MS spectra*). Contudo, a baixa quantidade de compostos isolados limitaram os estudos químicos através destes métodos. Após otimização dos métodos de extração, a cristalografia de raios-X permitiu identificar diversas outras moléculas, como a ET-729, ET-722,

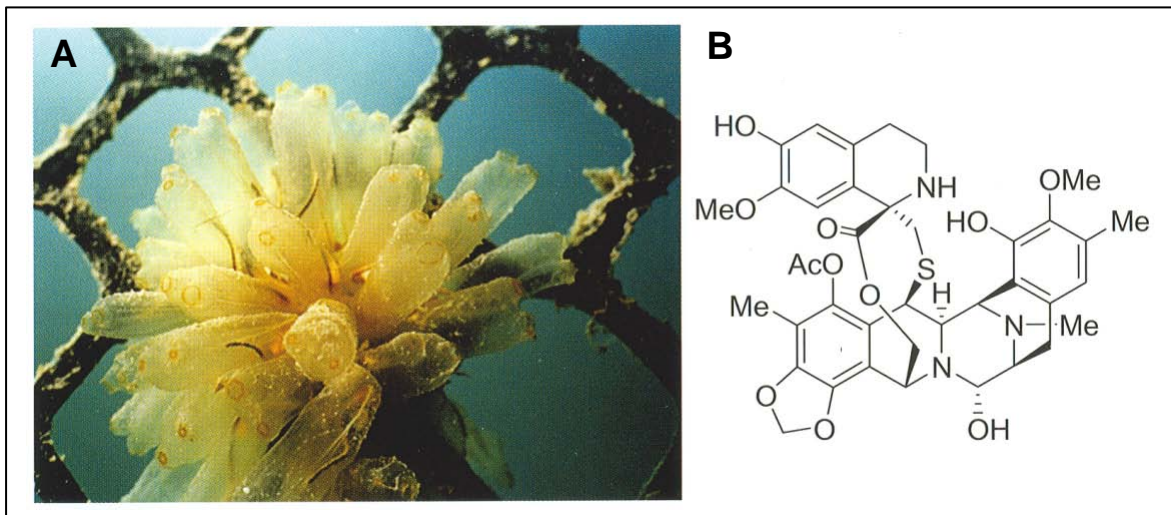
ET-736 (Sakai et al., 1992), ET-597, ET-583, ET-594 e ET-596 (Sakai et al., 1996). Os resultados destas análises indicaram uma nova classe de moléculas, denominadas de ecteinascidinas. A primeira molécula da família a completar as investigações pré-clínicas foi a ET-729 (Reid et al., 1996), mas a sua toxicidade inaceitável em roedores e cães conduziram aos estudos de outros análogos (Hill et al., 1994).

Atualmente, mais do que 12 moléculas já foram isoladas dos extratos de *E. Turbinata*, sendo que a ET-743 vem sendo amplamente estudada e tem mostrado atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo* (Guan et al., 1993; Izbicka et al., 1998; Rinehart, 2000; Ryan et al., 2001). Além da *E. turbinata*, outro tunicado encontrado na Tailândia também é conhecido por produzir ecteinascidinas, a *Ecteinascidia thurstoni* proporcionou recentemente o isolamento das ET-770 e ET-789 (Puthongking et al., 2006).

A ET-743 (**Fig.8B**) é um derivado tetraidroisoquinolínico relacionado estruturalmente aos antibióticos produzidos por microorganismos do gênero *Streptomyces*, como as safracinas, saframicinas e naftiridomicinas (Rao e Lown, 1992; Hill e Remers, 1991).

As três unidades tetraidroisoquinolínicas e seus anéis aromáticos (A, B, C) foram identificados por Holt (Holt, 1987), e, mais tarde, outros estudos realizados a partir das fórmulas parciais originaram a estrutura correta da ET-743 (Rinehart et al., 1990b). Sakai e colaboradores mostraram que a estereoquímica das subunidades A, B e C da ET-743 corresponde a família de antibióticos saframicinas (**Figs.9B, 9C**), sendo que a principal diferença entre a ET-743 e outros compostos tetraidroisoquinolínicos que não possuem propriedades antitumorais, é o anel C (Sakai et al., 1996; ZeewalFoote e Hurley, 1999).

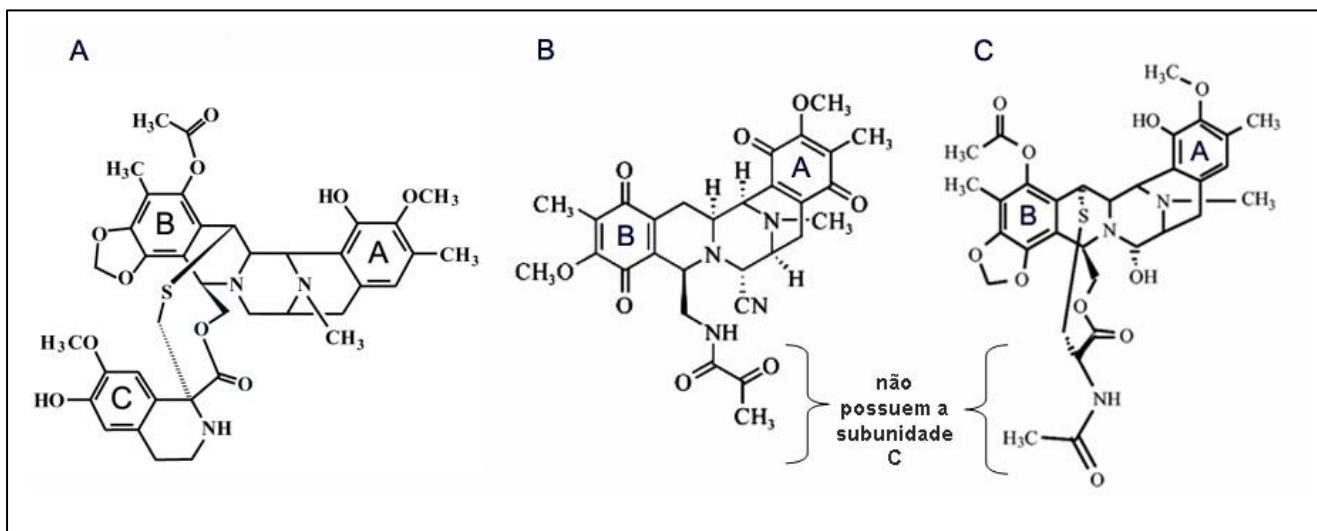




**Figura 8. *Ecteinascidia turbinata* e a estrutura química da ET-743. A)** tunicado marinho encontrado pela primeira vez no mar do Caribe. **B)** a estrutura química da ET-743.

Durante alguns anos, a eficácia da ET-743 como agente antitumoral foi atribuída ao anel C, presente na ET-743 e ausente nas saframocinas (Sakai et al., 1996). Contudo, uma molécula desta família que não possui o anel C, a ET-637 (**Fig.9B**), mostrou citotoxicidade similar a ET-743. Além disso, a ET-637 é capaz de induzir vias apoptóticas em células de leucemia, propriedade não encontrada na ET-743 (Erba et al., 2004).

Dando sequência aos estudos de identificação da sua estrutura, a ET-743 tornou-se um grande atrativo para os estudos de síntese química. A primeira rota completa para síntese da unidade tetraidroisoquinolínica da ET-743 foi desenvolvida em 1986 por Corey e colaboradores (Corey e Gin, 1996). Em 2003, outro intermediário da síntese da ET-743 foi proposto (Jin et al., 2003). Essas moléculas vieram facilitar a síntese da ET-743 e de outras ecteinascidinas, bem como, de outros compostos derivados desta estrutura que apresentem atividade biológica (Corey e Gin, 1996; Jin e Williams, 2003).



**Figura 9. Estruturas da ET-743, saframicina A e ET-637.** **A)** as subunidades A, B e C estão representadas na estrutura da ET-743. **B)** a saframicina A é um antibiótico da família das saframicinas que apresenta estrutura química similar a ET-743 mas não apresenta a subunidade C, assim como a **C)** a ET-637, derivado sintético da ET-743.

Dentre as moléculas sintetizadas a partir de intermediários da síntese da ET-743, a phthalascidina mostrou atividade antitumoral similar a ET-743 e superior a de agentes como taxol, camptotecina, adriamicina, mitomicina C, cisplatina, bleomicina e etoposideo, quando testada em diferentes linhagens celulares de tumores humanos (Martinez et al., 1999).

A síntese completa da ET-743 foi proposta por diversos grupos (Corey et al., 1996; Martinez e Corey, 2000; Endo et al., 2002; Chen et al., 2006; Fishlock e Williams, 2006) e uma rota de semisíntese a partir da cianosafracina B (antibiótico de origem bacteriana produzido através de fermentação pela *Pseudomonas fluorescens*), foi desenvolvida na indústria PharmaMar por Cuevas, Manzanares e colaboradores (Cuevas et al., 2000).

### 1.3.3 Mecanismo de ação

Em resposta aos resultados promissores que a ET-743 tem mostrado contra o desenvolvimento de tumores em modelos *in vitro* e *in vivo*, o seu mecanismo de ação vem sendo amplamente investigado (Izbicka et al., 1998; Ryan et al., 2001; Damia et al., 2001; Takebayashi et al., 2001b; Zewail-Foote et al., 2001).

#### **Ligação ao DNA**

Embora o mecanismo de ação da ET-743 ainda não tenha sido totalmente elucidado sabe-se que o DNA é o seu alvo primário. A interação da ET-743 com o DNA tem sido proposta com base em estudos de cristalografia de raio-X e modelagem molecular (Sakai et al., 1992; Guan et al., 1993).

O potencial padrão de hidrogênios da molécula indica que a ET-743 é capaz de se ligar na volta menor do DNA. Ainda, a ET-743 tem um centro carbinolamina onde a eliminação do grupo carboxila adjacente resulta em uma base de Schiff, vulnerável ao ataque nucleofílico. Este grupo carbinolamina reativo é responsável pela formação do aduto covalente da ET-743 no DNA (Guan et al., 1993). A alquilação no DNA ocorre no grupo amino (posição 2) de guaninas na volta menor da hélice (**Fig.10A**; Pommier et al., 1996; Moore et al., 1998).

Embora a ET-743 faça apenas uma ligação covalente com o DNA, estudos de modelagem molecular sugerem que os anéis A e B mantêm diversos outros pontos de contato com a molécula, através de pontes de hidrogênio (Guan et al., 1993), que são menos estáveis e reversíveis (Zewail-Foote e Hurley, 1999). Um modelo de ligação do ET-743 com a hélice dupla do DNA, baseado em NMR, mostrou que as subunidades A e B são responsáveis pelo reconhecimento e ligação da molécula no DNA, enquanto que a subunidade C fica projetada para fora (Moore et al., 1997).

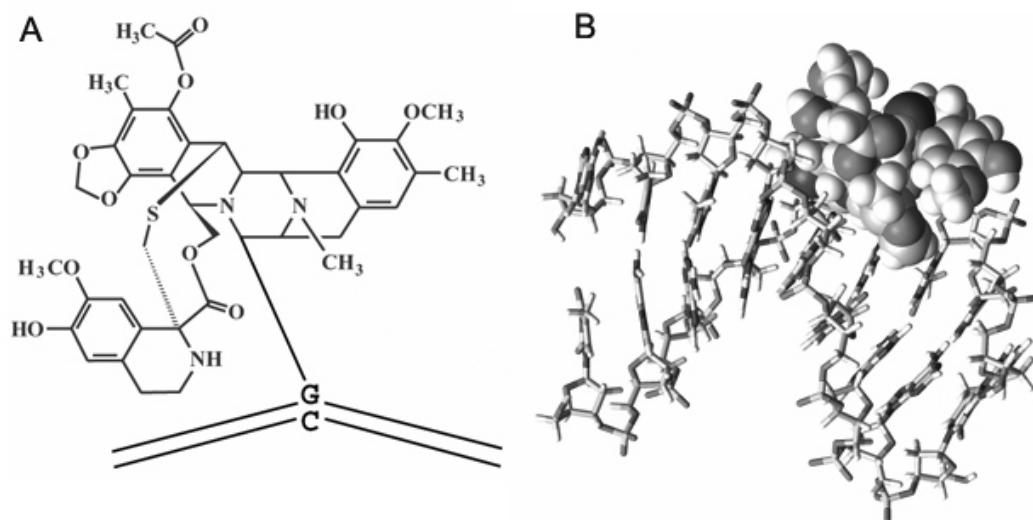
A ligação da ET-743 no DNA se dá em sequências preferenciais ricas em GC (Pommier et al., 1996) do tipo 5'-PuGC-3' ou 5'-PiGG-3' (Moore et al., 1997). Essa preferência de ligação difere a ET-743 de outros agentes alquilantes da volta menor, como o CC1065 e as duocarmicinas, que reagem seletivamente com sequências ricas em AT (Boger e Johnson, 1995).

Outras classes de compostos também alquilam-se na posição N2 de guaninas, como por exemplo, a mitomicina C (Chawla e Tomasz, 1988; Das et al., 1999) e algumas benzodiazepinas da série pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas: antramicina, sibiromicina, tomamicina, neotramicinas A and B, e saframicina (Petrusek et al., 1981; Petrusek et al., 1982; Smellie et al., 2003). Nessas moléculas o grupo mais importante para a atividade antitumoral é o carbinolamina, que também é encontrado na ET-743 e em outros antibióticos como as safracinas e naftiridomicinas (Hill e Remers, 1991; Rao e Lown, 1992).

Sabe-se ainda que a alquilação da ET-743 no DNA causa uma alteração na dinâmica da hélice do DNA. Esse efeito resultante da ligação covalente da ET-743 na estrutura do DNA foi estudado através de eletroforese em gel, utilizando como referência oligonucleotídeos contendo adeninas consecutivas (poli-A), que são conhecidos por induzirem torção no DNA em direção a volta menor. Os resultados indicaram que a reação da ET-743 com o DNA induz uma distorção na hélice (**Fig.10B**) na direção oposta a cauda poli-A. Este trabalho caracterizou a ET-743 como o primeiro exemplo de agente alquilante da volta menor capaz de induzir torção em direção a volta maior, propriedade que diferencia este composto de outras drogas estruturalmente similares (Zewail-Foote e Hurley, 1999).

Embora sendo o DNA o principal alvo da ET-743, análogos químicos da ET-743 contendo alterações no domínio de ligação no DNA, continuam apresentando

atividade biológica. A diminuição, mas persistência da atividade biológica em células tumorais sugere a existência de um alvo diferente do DNA (David-Cordonnier et al., 2005a).



**Figura 10. A** alquilação da ET-743 no DNA e sua influência na dinâmica da hélice. **A)** a ET-743 alquila o DNA através de uma ligação covalente em uma guanina. **B)** a ET-743, um agente alquilante da volta menor, é capaz de induzir uma torção em direção a volta maior (adaptado de Takebayashi et al., 2001a, Zewail-Foote et al., 2001).

### ***Interação com proteínas de ligação no DNA***

A maioria dos compostos que se ligam no DNA produzem modificações biológicas que resultam da interação com complexos de proteínas (Zewail-Foote e Hurley, 1999). A conformação do DNA após ligação da ET-743 e a projeção da droga para o exterior da hélice resultou na primeira hipótese sobre o mecanismo de ação deste agente alquilante. Foi sugerido que a ET-743 é capaz de produzir *crosslinks* DNA-proteína devido ao alvo principal da ET-743 ser a topoisomerase I (Takebayashi et al., 1999).

As DNA topoisomerasas são importantes alvos para a quimioterapia de tumores humanos (Pommier et al., 1999). Inibidores de topoisomerasas do tipo I

(Top1) e II (Top2) são drogas capazes de estabilizar os complexos de clivagem (intermediários catalíticos para as reações de topoisomerização), impedindo a reconstituição do DNA e o prosseguimento das funções normais da célula (Larsen et al., 2003; Pommier, 2006). A lista de inibidores Top2 é extensa e inclui agentes intercalantes como as antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina e epirubicina) (Moro et al., 2004), mitoxantrona, amsacrina, e outros agentes não-intercalantes como o VP-16 (etoposídeo) e o VM-26 (teniposídeo). Já para os inibidores de Top1 a única classe aprovada para uso clínico são os derivados da camptotecina (Pommier, 2006). Dois derivados da camptotecina, o irinotecan e topotecan são utilizados como segunda linha de tratamento para câncer colorretal e de ovário (Legarza e Yang, 2006; Markman, 2007). Outros compostos incluindo 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, OSI-211 (lurtotecan) (Mackenzie et al., 2004), DX-8951f (exatecan) (Reichardt et al., 2007) e BN 80915 (diflomotecan) (Larsen et al., 2001) têm sido clinicamente avaliados ou estão em fase de desenvolvimento pré-clínico.

A topoisomerase I foi identificada como um alvo da ET-743 através do método DPC (*DNA-protein crosslinks*) que detectou inicialmente a formação de *crosslinks* envolvendo uma proteína de 100KDa, posteriormente purificada e identificada como Top1 (Takebayashi et al., 1999). Os complexos cliváveis gerados pela ligação ET-743-DNA-Top1 foram mais persistentes do que aqueles induzidos por camptotecina (Takebayashi et al., 2001a). Contudo, a formação deste complexo não é o principal mecanismo de citotoxicidade da ET-743. Enquanto que a deleção do gene da topoisomerase I em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* confere resistência a camptotecina, o nível de sensibilidade não muda quando as células são tratadas com ET-743 (Damia et al., 2001).

Ainda com o objetivo de investigar a interação da ET-743 com proteínas que se ligam no DNA, D'Incalci e colaboradores analisaram a capacidade da ET-743 de inibir fatores de transcrição. Foram estudados três grupos de fatores: a) produtos oncogênicos, como MYC, C-MYB e Maf, b) ativadores de transcrição regulados durante o ciclo celular como E2F e SRF, c) fatores gerais de transcrição como Sp1, TBP e NF-Y. A maioria dos fatores testados não foi inibido ou mostrou inibição somente em altas concentrações (cerca de 300  $\mu$ M). Um dos fatores que foi preferencialmente inibido pela ET-743 foi o NF-Y, em concentrações que variaram de 10 a 30  $\mu$ M (Bonfanti et al., 1999; D'Incalci et al., 2002, Friedman et al., 2002). A pré-incubação de ET-743 com NF-Y resultou em inibição da ligação da ET-743 no DNA, sugerindo que a proteína é alvo para ligação do agente alquilante (Minuzzo et al., 2000). Ainda, sabendo-se que duas subunidades de NF-Y têm similaridade com histonas H2B e H4, foi sugerido que a ET-743 pode influenciar na reconstituição do nucleossoma e na remodelagem da cromatina (Minuzzo et al., 2000; Minuzzo et al., 2005).

Estudos também mostraram que a ET-743 inibe a ativação da transcrição do gene *MDR1* (*multidrug resistance 1*; Jin et al., 2000). Synold e colaboradores relataram que a ET-743 suprime a transcrição de *MDR1* como resultado da inibição de SXR (*steroid and xenobiotic receptor*; Synold et al., 2001; Kanzaki et al., 2002). A proteína SXR ativa a expressão de *MDR1* em hepatócitos e em células intestinais que codifica para a P-glicoproteína (P-gp), envolvida na via de excreção de diversos compostos quimioterápicos do organismo (Jin et al., 2000; Synold et al., 2001) e associada ao desenvolvimento de resistência às drogas (Scotto e Johnson., 2001). A atividade da ET-743 foi caracterizada em linhagens celulares que superexpressam a P-gp e foi encontrado que concentrações subtóxicas de ET-743 revertem a

resistência a doxorrubicina e vincristina nessas células. Estes estudos sugeriram a utilização da ET-743 em combinação com outros agentes que promovem a superexpressão da P-gp (Kanzaki et al., 2002).

Esses dados propõem a interferência da ET-743 com proteínas de ligação no DNA. Entretanto, as concentrações necessárias para interação com proteínas são muito mais altas do que as concentrações citotóxicas, estabelecidas na faixa de 10 pM até 10 nM (D'Incalci et al., 2002). Além disso, doses quatro vezes maiores do que o IC50 não foram suficientes para detectar *cross-links* DNA-proteína através do método de eluição alcalina em células de adenocarcinoma de cólon (Erba et al., 2001).

### ***Interferência com mecanismos de reparação de DNA***

Em vista da alquilação que a ET-743 promove no DNA, foi considerada a possibilidade de diferentes sistemas de reparação de DNA estarem envolvidos com os mecanismos de tolerância e/ou eliminação das lesões geradas pela ET-743. A partir disso, alguns grupos passaram a estudar a ação deste agente alquilante frente as vias de reparação de lesões no DNA.

Um estudo realizado em 2001 pelo grupo de Takebayashi sugeriu a interação da ET-743 com a maquinaria de reparação de DNA por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição (TC-NER; Takebayashi et al., 2001a). Células de *Xeroderma pigmentosum* (XP) deficientes nos genes do NER *XPG*, *XPA*, *XPD* ou *XPF* mostraram resistência a ET-743. Nesse caso, a sensibilidade foi reestabelecida após complementação com os genes do tipo selvagem. Ainda, o perfil de sensibilidade das células deficientes em *XPC* (sensíveis da mesma forma que a linhagem parental) ou nos genes implicados na síndrome de Cockayne (*CSA* e *CSB*:



resistentes) indicam que a citotoxicidade da ET-743 é especificamente dependente da via TC-NER (Takebayashi et al., 2001a). A maioria das outras drogas que causam alquilação no DNA, bem como a radiação UV, são conhecidas por agirem no sentido oposto, ou seja, aumentando a sensibilidade de células deficientes em NER (Damia et al., 1996; Damia et al., 2001; De Silva et al., 2002; D'Incalci et al., 2002).

A resistência de células deficientes em genes das vias de reparação de DNA a agentes antitumorais já foi descrita anteriormente. A perda do mecanismo de reparação de erros de emparelhamento de bases (*mismatch repair* ou MMR) é associada com resistência parcial a diversas drogas, incluindo cisplatina, carboplatina e etoposídeo (Aebi et al., 1997; Fink et al., 1998). Em contrapartida, uma deficiência na via MMR não tem influência na sensibilidade da ET-743 (Damia et al., 2001; Poindessous et al., 2003).

Considerando o envolvimento da via NER na atividade biológica da ET-743, Zewail-Foote e colaboradores estudaram o reconhecimento e a incisão dos adutos ET-743-DNA pelo complexo UvrABC nuclease de *Escherichia coli*. O complexo UvrABC nuclease media a via NER em procariotos e tem analogia funcional com o TC-NER de eucariotos (Zewail-Foote et al., 2001). Este estudo mostrou que nem todos os adutos ET-743-DNA são igualmente incisados pelo complexo UvrABC nuclease, e que os adutos de sequências não-preferenciais são eliminados com maior eficiência comparado com os adutos formados em sequências preferenciais. Os autores propõem que os adutos, quando não eficientemente reparados, formam complexos citotóxicos com as proteínas da via NER, resultando em morte celular. Além disso, na ausência do complexo UvrABC nuclease intacto, a lesão tóxica é

incapaz de se formar e os adutos mesmo não sendo reparados pelo NER são menos tóxicos para as células (Zewail-Foote et al., 2001).

Atualmente, acredita-se que a citotoxicidade da ET-743 esteja relacionada com a sua interferência com a maquinaria do NER, mas os níveis moderados de resistência (2 a 8 vezes) de células deficientes em NER (Takebayashi et al., 2001a; Damia et al., 2001; Erba et al., 2001; Soares et al. dados não publicados) sugerem que este não é o único mecanismo de ação da droga.

Além da via NER, o sistema de reparação de quebras duplas foi também investigado. Através da utilização de linhagens de glioblastoma (MO59K e MO59J), proficientes e deficientes na proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) foi mostrado que nas células onde a DNA-PK está ausente a ET-743 é mais citotóxica. Ainda, o pré-tratamento de células de carcinoma de cólon (HCT-116) com wortmannina, um potente inibidor de DNA-PK, sensibiliza as células à ET-743 (Damia et al., 2001).

A ET-743 também influencia na atividade de helicase da enzima RecBCD de *Escherichia coli*. Comparada a outros dois agentes alquilantes monofuncionais (hedamicina e adozelesina), a ET-743 é o mais potente inibidor da enzima (Dziegielewska et al., 2006).

Embora a interferência da ET-743 com os sistemas de reparação de DNA não tenha sido totalmente elucidada, os estudos realizados nesta direção permitiram concluir que a ET-743 apresenta um mecanismo de ação peculiar, diferente de outros agentes alquilantes, passando a ser considerada protótipo de uma nova classe de agentes antitumorais (Damia et al., 2001; D'Incalci et al., 2002).

### ***Interferência no ciclo celular e apoptose***

Assim como muitas outras drogas que interagem com o DNA, a ET-743 causa perturbação no ciclo celular. Após tratamento com ET-743 em baixas concentrações (cerca de 10nM), as células apresentam progressão mais lenta durante a passagem das fases G1 até G2, com inibição da síntese de DNA e bloqueio em G2/M (Erba et al., 2001; Li et al., 2001; Martinez et al., 2001; Takebayashi et al., 2001a; Gajate et al., 2002). Esses efeitos não parecem ser dependentes de p53, já que foram observados em ambas as células, que expressam ou não o gene p53 funcional (Erba et al., 2001). Contudo, um estudo mais recente mostrou que a extrema sensibilidade de linhagens tumorais de diferentes tipos de sarcomas tratadas com ET-743 correlaciona com mutações em p53 (Moneo et al., 2007).

Os efeitos da ET-743 em células sincronizadas nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular foram estudados em linhagens de câncer de cólon SW620. Através da técnica de centrifugação e eluição é possível identificar frações de células que sedimentam de acordo com os seus diferentes tamanhos e, conseqüentemente, caracterizam a sua posição no ciclo celular. Após tratamento com diferentes concentrações de ET-743 (na faixa de nM), a viabilidade celular é medida pelo do teste clonogênico (Erba et al., 2001). Os resultados destes estudos mostraram que células sincronizadas em G1 apresentam alta sensibilidade à ET-743, sendo a menor sensibilidade observada quando as células encontram-se na fase G2/M (Erba et al., 2001; D'Incalci et al., 2002).

Dando seqüência a estes estudos, a ET-743 foi caracterizada como um agente alquilante que produz efeitos apoptóticos dose-dependentes (Gajate et al., 2002). Estudos da morfologia celular através de microscopia de fluorescência mostraram que a combinação de ET-743 com doxorubicina (DOX) aumenta a

resposta apoptótica em linhagens celulares de fibrosarcoma (HT-1080; 100 pM de ET-743 + 10 nM de DOX por 48 horas) e liposarcoma (HS-18; 400 pM de ET-743 + 40 nM de DOX por 48 horas). A condensação e/ou fragmentação do núcleo, indicativo de apoptose, não foi observada no tratamento com ET-743 como único agente (Takahashi et al., 2001).

Contrário aos resultados encontrados por Takahashi et al. (2001), o grupo de Gajate e colaboradores através de análises em citômetro de fluxo e utilizando linhagens celulares de leucemia (HL-60), adenocarcinoma cervical (HeLa) e câncer de mama (MCF-7) mostrou que após inibir a proliferação celular em doses de 1-10 ng/mL, a ET-743 causa bloqueio das células em G2/M e subsequente apoptose. Em concentrações superiores a 10 ng/mL observa-se apoptose sem prévio bloqueio do ciclo celular. Estes efeitos resultam da ativação de duas vias diferentes de sinalização, uma via dependente de transcrição que leva ao bloqueio do ciclo celular e uma via independente de transcrição que conduz a rápida apoptose e envolve o citocromo c mitocondrial, JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase*) e caspase-3 (Gajate et al., 2002).

O impacto da função da telomerase na sensibilidade celular à ET-743 também foi investigado (Biroccio et al., 2003). A atividade de telomerase tem sido encontrada em quase todos os tumores, mas não em células adjacentes normais (Hsu e Lin, 2005). A principal hipótese para explicar esse fato é que a estabilidade dos telômeros é requerida para a proliferação de células tumorais (Biroccio et al., 2003). Usando como modelo uma linhagem de melanoma humano com atividade reduzida de telomerase (*human telomerase reverse transcriptase*, hTERT), foi demonstrado que a reconstituição da atividade de telomerase restaura a função dos telômeros e diminui a sensibilidade à ET-743. Entretanto, nas células sem reconstituição da

telomerase (-hTERT) tratadas com ET-743 ou cisplatina a permanência na fase G2/M leva a um bloqueio irreversível e a ativação de um programa de apoptose. A apoptose foi observada somente em células -hTERT usando o teste TUNEL (*deoxynucleotidyl transferase dUTPnick-end labeling (TUNEL)-based apoptosis detection Kit*) e parâmetros de citometria de fluxo. Com base nestes resultados, os autores sugerem a utilização de inibidores da telomerase anteriormente ao tratamento com ET-743 (Biroccio et al., 2003).

Em paralelo com os estudos de ciclo celular, análises de *microarray* mostraram que de 12.625 genes, 89 estavam alterados (0,71%) (20 *down-regulated* e 69 *up-regulated*), quando as células foram tratadas com ET-743 em condições que induzem parada de ciclo celular (1 ng/mL por 48 horas). A ET-743 regula a expressão de cinco genes que podem explicar os efeitos dependentes de transcrição relacionados ao ciclo celular, são eles: *ciclina G2*, *GADD45A* e *p21* (*up-regulation*) e histones, *MCM5* (*down-regulation*) (Gajate et al., 2002). Alterações nesses genes têm sido relacionadas a bloqueio de células na fase G2/M em diferentes sistemas (Ando et al., 2001; Gajate et al., 2002).

Ainda com o objetivo de investigar a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular e na indução de apoptose, Martínez et al. (2005) analisaram 6.700 genes em linhagens de STS extraídos de pacientes que apresentavam diferentes padrões de sensibilidade a ET-743. O perfil de expressão dos genes revelou *up-regulation* de 86 genes e *down-regulation* de 244 genes em resposta a ET-743 na maioria das linhagens analisadas. Diversos genes (por exemplo *CS-1*, *ATF3*, *SAT*, *JUNB*, *GADD45* e *ID2*) conhecidos por terem um papel comum como reguladores de transcrição levando a paradas do ciclo celular, bloqueio em G2/M e apoptose (Martinez et al., 2005), foram induzidos após tratamento com ET-743. A

expressão aumentada de genes indutores de apoptose, como *PAR4* e *CASP8AP2*, e alguns alvos conhecidos de p53 como *TP53DINP1* e *CDKN1A* também foi encontrada (Martinez et al., 2005). Interessantemente, após 72 horas de tratamento, linhagens celulares de STS sensíveis a ET-743 mostram ativação de genes sensores de danos no DNA, como *RAD17* e *BRCA1* (Martinez et al., 2005). A expressão de *BRCA1* já foi relatada como um determinante molecular na resposta apoptótica após tratamento com diferentes agentes antitumorais (Quinn et al., 2003).

### **Combinação com outros agentes**

Considerando as diferenças observadas entre a ET-743 e os outros fármacos antitumorais utilizados frequentemente na clínica, a ET-743 foi avaliada em combinação com outras drogas.

Dados pré-clínicos indicam sinergismo entre a ET-743 e as antraciclinas, taxanos, cisplatina e irinotecan (Held-Warmkessel, 2003; Meco et al., 2003; Riccardi et al., 2005). É interessante destacar que a ET-743 potencializa a atividade antitumoral da cisplatina em concentrações (cerca de 0,25 nM) que produzem moderado ou nenhum efeito quando utilizada como único agente. Estes efeitos foram evidenciados tanto em linhagens celulares de tumores humanos (*in vitro*) como em modelos animais (*in vivo*) (D'Incalci et al., 2002; D'Incalci et al., 2003).

Sinergismo dependente da sequência de administração foi observado quando a ET-743 é combinada com doxorrubicina ou paclitaxel em células de STSs (HT-1080 e HS-18) e de câncer de mama (MX-1 e MCF7) (Takahashi et al., 2001; Takahashi et al., 2002). Nas linhagens de STSs, os melhores efeitos foram obtidos quando as células foram tratadas inicialmente com ET-743 seguidas de doxorrubicina e, por exposição das células ao paclitaxel seguidas de ET-743

(Takahashi et al., 2001). A importância da sequência de administração pode ser ilustrada pela combinação de ET-743 e paclitaxel nas linhagens de câncer de mama. Nesse caso, quando a ET-743 é administrada antes ou concomitantemente com o paclitaxel observa-se forte antagonismo na citotoxicidade (Takahashi et al., 2002).

Recentemente, além da combinação de agentes antitumorais, tratamentos combinando quimioterapia e radioterapia tem sido extensivamente investigados em estudos clínicos. Neste sentido, resultados promissores já foram obtidos para uma variedade de tumores como cabeça e pescoço, NSCLC e cérvix. A interação da ET-743 com radiação foi investigada em estudos *in vitro* através da utilização de diferentes linhagens de tumores humanos [ECV304 (bexiga), H292 e A549 (pulmão) e CAL-27 (língua)]. As células foram tratadas com ET-743 (1-2nM) durante 24 horas e receberam a radiação antes ou após este tratamento. A avaliação da radiosensibilidade foi realizada através do método SRB (*sulforhodamine B*). Os resultados mostraram que o tratamento com ET-743 após a radiação não resulta em radiosensibilização. Entretanto, os autores acreditam que a moderada radiosensibilização encontrada no tratamento onde a ET-743 foi administrada antes da radiação é decorrente do bloqueio do ciclo celular em G2/M (Simoens et al., 2003).

Ainda, outros fármacos que não os agentes antitumorais podem ser associados a um tratamento anticâncer. A administração de determinados medicamentos pré-quimioterápicos tem a finalidade de diminuir a incidência de efeitos colaterais do agente antitumoral em questão. Evidências em modelos pré-clínicos animais sugerem que o pré-tratamento com altas doses de dexametasona seguido de ET-743 reduz significativamente os efeitos hepatotóxicos do agente alquilante (Donald et a., 2003). Outros moduladores do metabolismo hepático de

drogas também foram estudados. O monitoramento dos níveis plasmáticos de bilirrubina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e a histopatologia indicaram que pré-tratamentos com  $\beta$ -naphthoflavone e fenobarbitona, mas não com N-acetilcisteína, protegem a hepatotoxicidade causada pela ET-743 *in vivo* (Donald et al., 2003; Donald et al., 2004). Os resultados sugerem que esta proteção possa ser resultado da indução de enzimas do citocromo P450 (Donald et al., 2004).

Os resultados promissores obtidos em modelos animais conduziram o grupo de Grosso e colaboradores a desenvolver um estudo com 54 pacientes portadores de sarcomas em fase avançada. Nos pacientes que receberam a pré-medicação dexametasona, os parâmetros analisados não mostraram variações significativas. No grupo de pacientes que não recebeu a pré-medicação ocorreu elevação das transaminases (34%), neutropenia (24%) e trombocitopenia (25%). Acredita-se que o efeito protetor da dexametasona contra a hepatotoxicidade e mielossupressão não deva ser simplesmente relacionado ao aumento da eliminação da ET-743, mas a uma complexa interferência com os processos de metabolização (Grosso et al., 2006).

### **Metabolismo e toxicidade**

Os dados sobre o metabolismo da ET-743 são limitados. Sabe-se que a ET-743 é convertida em um grande número de compostos e que estes são excretados nas fezes e na urina. A urina e as fezes de pacientes que receberam a ET-743 marcada com  $^{14}\text{C}$  [ $^{14}\text{C}$ ]trabectedin] analisadas por cromatografia líquida e espectrometria de massa (HPLC/MS) revelaram a presença de diversos metabólitos como ET-745, ET-759A, ETM-259, ETM-217, ETM-204 e ET-731 (Beumer et al., 2007).



A eficácia de muitos agentes farmacológicos é limitada pela sua ativação metabólica e excreção. Diversos agentes incluindo paclitaxel, verapamil, ibuprofeno, benzodiazepinas, entre outros, estão sujeitos a inativação metabólica pelas enzimas do citocromo P450 (CYPs; Reid et al., 2002). Estudos realizados em preparados de células microssomais humanas e em ratos, importantes modelos pré-clínicos utilizados para prever a toxicidade de drogas em humanos, mostraram que as enzimas da família CYP3A predominam na metabolização da ET-743 (Reid et al., 2002; Brandon et al., 2006). O metabolismo da ET-743 foi ativado após tratamento com indutores de CYP3A (dexametasona e fenobarbital), enquanto que inibição do metabolismo foi observada após emprego de inibidores destas enzimas ( $\alpha$ -naftoflavone e quercetina). Análises de *immunoblotting* mostraram que o aumento do metabolismo foi associado com aumento da expressão das isoenzimas CYP3A1 e CYP3A2, mas não de CYP2B1 (Reid et al., 2002).

A ET-729 (ET-743 desmetilada) foi identificada como principal metabólito da ET-743 nas células microssomais através de HPLC/MS e NMR. Outros metabólitos oxidativos, bem como, um conjugado glicurônico e a ET-743 desacetilada foram encontrados em pequenas concentrações (Scotto 2001; Hill et al., 1994; Reid et al., 2002). Segundo os autores, a presença da ET-729 como metabólito da ET-743 sugere que este composto seja o responsável pela hepatotoxicidade observada nos ensaios clínicos (Sparidans et al., 2001; Reid et al., 2002; Beumer et al., 2005).

Diversos estudos de fase II mostraram que a hepatotoxicidade é o principal efeito adverso relatado para a ET-743, resultando em aumento das transaminases (revisado em Beumer et al., 2005 e Fayette et al., 2006). Outros efeitos indesejáveis são alterações hematológicas (neutropenia), flebite no local da infusão, náuseas,

vômitos (Twelves et al., 2003) e rabdomiolisis (Skorupa et al., 2007). Em contrapartida, não foram observadas, alopecia e diarreia (Twelves et al., 2003).

#### **1.3.4 Atividade antitumoral e ensaios clínicos**

Inicialmente, a ET-743 foi avaliada através de estudos pré-clínicos realizados no NCI (*National Cancer Institute*) onde foi utilizado um painel de linhagens tumorais humanas para identificar a atividade citotóxica, estabelecida na faixa de nanomolar (Rinehart et al., 1995; Eckhardt et al., 1996). Nas células humanas a ET-743 foi principalmente ativa contra tumores de mama, pulmão, cérebro, ovário, melanoma e carcinoma de cólon (Hendriks et al., 1999), bem como, em diferentes tipos de linhagens de STSs (Scotlandi et al., 2002). Paralelamente foram realizados estudos usando modelos xenógrafos de animais infectados com diferentes tumores humanos (Valotti et al., 1998), onde foram observados baixo nível, ou não aparecimento de resistência cruzada com outros agentes quimioterápicos considerados padrões (Izbicka et al., 1998; Li et al., 2001; Amador et al., 2003).

Levando em consideração o perfil de resposta observado durante a fase I dos ensaios clínicos, foi possível estabelecer um regime de infusão contínua da ET-743 durante 24 horas (Delaloge et al., 2001), uma vez a cada 3 semanas na dose máxima de  $1800 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , sendo a dose recomendada  $1500 \mu\text{g}/\text{m}^2$  (Taamma et al., 2001; Yovine et al., 2001; George et al., 2002). Tumores de ovário, mama e tumores mesenquimais previamente tratados com compostos platinados e taxanos, responderam positivamente a ET-743 nos ensaios clínicos de fase I (Amador et al., 2003).

Durante a fase II, a eficácia e a toxicidade da ET-743 foram testadas em diferentes grupos de pacientes portadores de câncer colorretal (Paz-Ares et al., 2007) e câncer de mama (Zelek et al., 2006). Contudo, a ET-743 foi principalmente efetiva em tumores avançados do tipo sarcomas, tanto em pacientes previamente tratados com outras drogas (Yovine et al., 2004; Garcia-Carbonero et al., 2004; Huygh et al., 2006; Tewari et al., 2006; Hartmann, 2007; Grosso et al., 2007) como quando utilizada como terapia de primeira linha (Garcia-Carbonero et al., 2005).

STSs são um grupo heterogêneo de tumores de origem mesenquimal, raros, perfazendo menos de 1% dos tumores malignos. Apresentam comportamento biológico agressivo e de difícil prognóstico, sendo que 40 a 50% dos pacientes desenvolvem metástases e morrem como consequência da disseminação da doença (Kotilingam et al., 2006). STSs avançados e metastáticos são frequentemente tratados com quimioterapia, contudo poucos agentes citotóxicos fornecem bons resultados. A doxorrubicina como agentes único é referência como primeira linha de tratamento (Verweij et al., 2000), seguida da ifosfamida e dacarbazina (Clark et al., 2005).

A fase II e III dos ensaios clínicos continuam na Europa e nos Estados Unidos para STSs, câncer de ovário, endométrio, próstata e pulmão, revelando notável sucesso nas terapias onde utiliza-se combinação de drogas (Newman e Cragg, 2004).

### **1.3.5 Outras propriedades farmacológicas**

Em paralelo com os estudos das propriedades antitumorais da ET-743, alguns grupos de pesquisa voltaram suas atenções para investigar outras ações farmacológicas deste agente.

A ET-743 inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos *in vitro*, incluindo macrófagos associados a tumores (*tumor-associated macrophages*, TAMs). Nestas células, em concentrações sub-citotóxicas, a ET-743 reduz significativamente a produção de duas citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e CCL2 (Allavena et al., 2005), conhecidas pelo seu papel na progressão de tumores através da regulação de diversos processos biológicos, incluindo a divisão celular, diferenciação e sobrevivência (Nishimoto et al., 2004). Segundo os autores, o efeito inibitório da ET-743 sobre a viabilidade de macrófagos, diferenciação e produção de citocinas deve contribuir como agente antiinflamatório em tumores humanos associados à inflamação (Allavena et al., 2005).

Após intenso estudo de *screening* entre compostos contidos em seu laboratório, o grupo de Takahashi encontrou intermediários da síntese da ET-743 como sendo inibidores de  $\gamma$ -secretase, enzima envolvida na síntese do peptídeo amilóide- $\beta$  (A $\beta$ ). Depósitos de A $\beta$  no córtex cerebral juntamente com perda neuronal caracterizam os principais sintomas da doença de Alzheimer (Takahashi et al., 2006).

## II. OBJETIVOS

## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar os mecanismos moleculares implicados no reconhecimento das lesões de DNA induzidas pela ET-743 a partir da utilização de linhagens de levedura e de linhagens celulares de mamíferos proficientes e deficientes nos mecanismos de reparação de DNA.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estabelecer a relação existente entre as vias de reparação de DNA (NER, BER, HR e TLS) e a citotoxicidade induzida pela ET-743;
- Avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos da ET-743 em modelos de levedura;
- Medir a formação de quebras de DNA induzidas pela ET-743 em células tumorais humanas;
- Determinar a influência da síntese macromolecular na citotoxicidade induzida pela ET-743;
- Analisar a progressão do ciclo celular de linhagens proficientes e deficientes no sistema de recombinação homóloga após tratamento com ET-743;
- Avaliar a eficiência da reparação do DNA nas células proficientes e deficientes em recombinação homóloga tratadas com ET-743;
- Observar a capacidade da ET-743 de induzir danos cromossômicos em linhagens deficientes na via de reparação por recombinação homóloga;
- Evidenciar marcadores moleculares potenciais com o objetivo de prever uma provável resposta dos pacientes tratados com ET-743.

# III. CAPÍTULO 1

***LOW CYTOTOXICITY OF ECTEINASCIDIN 743 IN YEAST LACKING  
THE MAJOR ENDONUCLEOLYTIC ENZYMES OF BASE AND  
NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR PATHWAYS***

***Biochem Pharmacol 70 : 59–69, 2005***

## APRESENTAÇÃO

O interesse em estudar o mecanismo de ação do agente alquilante ecteinascidina-743 decorreu de informações publicadas no ano de 2001 sobre a interferência da ET-743 com o mecanismo de reparação de DNA por excisão de nucleotídeos. Um estudo realizado por Takebayashi e colaboradores mostrou que linhagens celulares tumorais selecionadas pela sua resistência à ET-743 apresentavam alterações cromossômicas na região que incluía um gene implicado na doença hereditária xeroderma pigmentoso. A partir disto, foi sugerido que o NER acoplado a transcrição (TC-NER) estava envolvido nos mecanismos de sensibilização celular após tratamento com ET-743.

Tendo a ET-743 um mecanismo de ação peculiar, isto é, diferente de outros agentes alquilantes antitumorais, como por exemplo cisplatina, esta droga se revelou um novo alvo de estudos para o tratamento do câncer. Em vista disto, a coleção de linhagens de levedura mutantes em diferentes vias de reparação de DNA disponível em nossos laboratórios nos conduziu a investigar a sensibilidade destes mutantes frente à ET-743.

Historicamente, a levedura, particularmente a *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido usada como modelo para avaliar a eficácia e a seletividade de diversos fármacos, bem como, para identificar novos alvos de drogas antitumorais. A utilização deste sistema apresenta diversas vantagens. A levedura é um organismo eucariótico simples que possui o seu genoma sequenciado e pode ser facilmente manipulada para a obtenção de mutantes em vias bioquímicas específicas. Além disso, sabe-se que as proteínas de reparação de DNA são conservadas entre os organismos eucarióticos. Ainda que os modelos de levedura não possam substituir



completamente as células tumorais humanas para estudos farmacológicos, elas são um sistema experimental indispensável para o *'screening'* de novas moléculas e identificação de novos alvos de atuação.

Neste estudo, além da sensibilidade dos diferentes mutantes à ET-743, foram realizados também ensaios de avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico deste agente. Estes ensaios tiveram o objetivo de verificar a funcionalidade dos sistemas de reparação dos danos gerados pela ET-743 nas células da levedura.

Os resultados obtidos com este estudo nos permitiram propor um modelo para explicar o mecanismo de citotoxicidade da ET-743 em células eucarióticas. Este modelo mostra a interrelação entre diferentes sistemas de reparação de DNA implicados na citotoxicidade, reparação e tolerância dos danos causados pelo agente alquilante.

Além do mecanismo molecular proposto, este trabalho proporcionou uma possível explicação para a especificidade da ET-743 em tumores do tipo sarcomas. Recentemente, a ET-743 tem se mostrado um agente muito eficaz contra este tipo de tumor, que embora seja uma doença rara, é conhecida por não responder eficazmente a outros agentes antitumorais disponíveis na clínica.

## Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways

Daniele Grazziotin Soares<sup>a,c</sup>, Nadine Paese Poletto<sup>b</sup>, Diego Bonatto<sup>c</sup>,  
Mirian Salvador<sup>a,b</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>d</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>b,c,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Caxias do Sul (UCS), RS, Brasil

<sup>b</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul (UCS), RS, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>d</sup>Serviço de Oncologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>e</sup>Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

Received 22 November 2004; accepted 1 April 2005

### Abstract

Ecteinascidin 743 (ET-743) is a promising antitumoral drug for the treatment of soft tissues sarcomas, becoming a good candidate for clinical trials. However, the molecular mechanism of how ET-743 induces cells death is poorly understood. The chemical structure of ET-743 suggests that it can form cytotoxic cross-links with proteins and DNA. Experiments with *Escherichia coli* and mammalian cells indicate that the nucleotide excision repair (NER) pathway promotes ET-743 cytotoxicity. We therefore analyzed cytotoxicity and tolerance to ET-743 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, defective for NER and/or base excision repair (BER), either in single mutants or in combination with mutant alleles of genes encoding proteins involved in DNA translesion synthesis (TLS) and homologous recombination (HR). Treatment of haploid and diploid *S. cerevisiae* strains with ET-743 led to induced mutagenesis, mitotic gene conversion, and crossing-over. The results indicated that yeast strains lacking endonucleases of the NER and BER pathways are especially resistant for ET-743. The mutagenesis data points to a weak mutagenic activity of ET-743 in both WT and strains lacking BER/NER endonuclease, and that a mutant blocked in both BER and TLS totally lacks induced mutagenesis. The diploid strain shows an increase in the frequencies of crossing-over and mitotic recombination. These data lead us to propose a model for ET-743 action in eukaryotic cells, where the presence of BER and NER endonucleases results in cell death. However, ET-743 damage can be tolerated in BER and/or NER mutants by TLS (error-prone) or in combination with HR (error-free).

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** ET-743; Base excision repair; Nucleotide excision repair; *Saccharomyces cerevisiae*; Apn1p; Rad1p

### 1. Introduction

The ecteinascidins (ETs) are extremely potent antitumor agents isolated from marine tunicate Caribbean sea *Ecteinascidia turbinata* [1,2], with a good activity in different in vitro and in vivo pre-clinical models [3–6]. Of the numerous ETs that have been isolated, ET-743 is the most

promising compound, based on its cytotoxicity and its abundance in the tunicate [2]. ET-743 is an alkaloid composed of three fused tetrahydroisoquinoline rings and is structurally related to the DNA-reactive saframycins [7,8]. The main structural difference between ET-743 and the antibiotic saframycin, which does not possess antitumoral properties, is an extra ring (C subunit). While the A and B subunits of ET-743 provide the scaffold for DNA recognition and binding, the C subunit protrudes out of the minor groove, making only limited contacts with the DNA [9] (Fig. 1A–C).

The precise mechanism of action of ET-743 has yet to be fully understood, but DNA appears to be the primary target [10]. The compound forms a covalent adduct at the N2

**Abbreviations:** BER, base excision repair; ET-743, ecteinascidin 743; LOG, exponential phase; HR, homologous recombination; NER, nucleotide excision repair; SSBs, single-strand breaks; STSs, soft tissue sarcomas; SC, synthetic complete medium; TC-NER, transcription-coupled NER; TLS, translesion synthesis; WT, wild type

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 316 7602; fax: +55 51 316 6084.

E-mail address: [pegas@cbiot.ufrgs.br](mailto:pegas@cbiot.ufrgs.br) (J.A.P. Henriques).

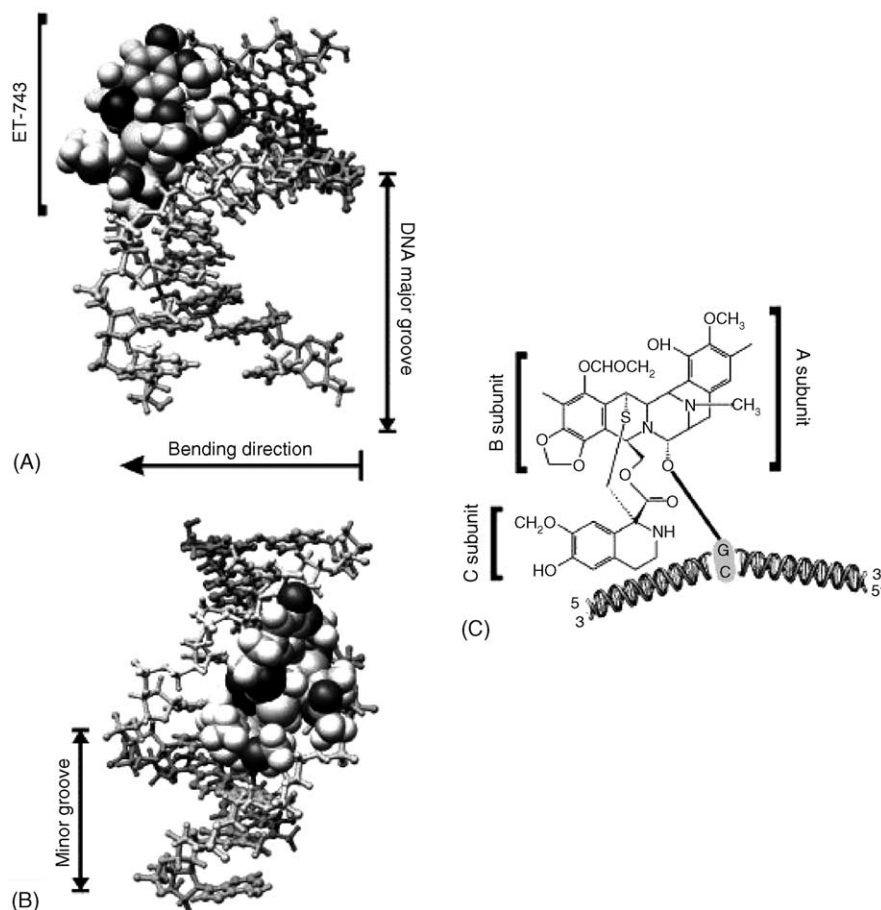


Fig. 1. Stereoisomer view (A and B) and chemical structure of ET-743 (C) alkylated to N2 position of guanine in the DNA minor groove. In (A) and (B) the alkylation produces a bend toward the DNA major groove. The A–C subunits are shown in (C).

position of guanine in the minor groove of duplex DNA and thus bends DNA toward the major groove [3,11–13] (Fig. 1A and B). The sequence specificity of the interaction between ET-743 and DNA occurs at guanines located either in the sequence 5'-PuGC-3' or 5'-PyGG-3' [3,14]. The first proposed target to explain the mechanism of action was topoisomerase I, which forms protein-DNA cross-links in the presence of ET-743 [15,16]. The cytotoxic activity of ET-743 was equally on WT and yeast strains deleted for *top1* indicating that DNA-topoisomerase I is not the primary target for this drug [17]. Recent reports have demonstrated a very unique response in mammalian NER-deficient cells. Tumor cells lacking the full complement of NER enzymes XPG and XPF-ERCC1, involved in TC-NER, were found to be significantly less sensitive to ET-743 as compared with NER-proficient cells lines. One possible mechanism to explain the TC-NER mediated cytotoxicity is the formation of DNA SSBs in NER-proficient cells and their relative absence in XPA- and XPD-deficient fibroblasts cells [18], indicating that ET-743 lethality is induced by TC-NER mediated SSBs in transcribed genes. However, not all ET-743-DNA adducts are equally incised by UvrABC proteins [14]. ET-743 adducts

at the nonpreferred sequences were incised with the highest efficiency, whereas adducts at the preferred sequences (5'-AGC and 5'-TGC) were incised to a lesser extent. Apparently adducts that are not efficiently removed trap DNA-NER proteins, thus forming cytotoxic complexes. Since is not clear how this alkaloid influences DNA and its repair, we chose the unicellular eukaryotic organism *Saccharomyces cerevisiae* in order to better understand the molecular mechanism of action of this drug. The choice of this organism was based on the fact that biochemical pathways in yeast and mammalian cells are highly conserved. Moreover, yeast cells can be easily genetically manipulated and mutants for specific biochemical pathways can be generated rapidly [19]. In this contribution we will present the ET-743 sensitivity of single, double, triple, and quadruple mutants that are blocked in different mechanisms of DNA repair pathways. Induced mutagenesis was assayed in haploid *S. cerevisiae* strain XV185-14C, where two types of mutations (locus-specific, reversion of the *lys1-1* ochre or *his1-7* missense allele) and frameshift (*hom3-10*) can be detected. Possible recombinogenic effects of ET-743 were investigated in the diploid yeast strain XS2316, which allows the detection of two forms of mitotic recombination

(crossing-over and gene conversion). In addition, we have studied the induction of canavanine forward mutations in WT and different repair mutants after treatment with ET-743.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Drug, yeast strains, and culture media

ET-743 (PharmaMar S.A.) aqueous stock solution ( $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. Complete liquid medium (YPD) containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto-peptone and 2% (w/v) glucose was used for routine growth. For plates, the medium was solidified with 2% (w/v) bacto-agar. The chemicals were from Merck & Co. and Sigma Co. The minimal medium (MM) contained 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) bacto-agar. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan, and 24 mg threonine per 100 mL MM. For mutagenesis, the omission media, lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (SC-hom) were sub-supplemented with 0.1 mg lysine, 0.1 mg histidine, or 0.1 mg methionine per 100 mL MM, respectively. In this case, the use of a MM containing the relevant nutritional requirements in a limiting concentration allows: (i) to restrict the cells growth at a titer below the plate's saturation level and (ii) to study the number of yeast revertant colonies from a

determined amino acid auxotrophy to its respective prototrophy, which arose due to a mutagenic treatment [20]. The SC-lysine medium contained only 0.5 mg adenine. For canavanine resistance, medium SC-Arg was supplemented with  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  canavanine. For recombinogenesis, leucine was omitted from the synthetic medium (SC-leu), or supplemented with 0.2% (w/v) cycloheximide (SC + cyh). A saline solution [0.9% (w/v) NaCl] was employed for dilution of cell suspensions. Phosphate-buffered saline (PBS;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mM; pH 5.8) was used for cell's incubation with ET-743.

### 2.2. Yeast growth conditions

Exponential phase (LOG) cultures were obtained by inoculation of  $5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of YPD culture in stationary phase (STAT) into 5 mL of fresh YPD medium. After 14 h incubation, at  $28^\circ\text{C}$ , with aeration by shaking, the cultures contained  $(1-2) \times 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  with 20–30% budding cells. Cells were harvested and washed twice with saline solution. The number of cells with and without buds was determined by counting in Neubauer chamber.

### 2.3. Survival assays

To determine sensitivity to ET-743, cell suspensions were prepared containing  $2 \times 10^6$  LOG cells  $\text{mL}^{-1}$  with and without ET-743, and incubated in PBS at  $28^\circ\text{C}$  for 5 h with agitation. After incubation, samples were diluted in saline solution, plated onto YEPD agar, and survival was assayed after 48 h at  $28^\circ\text{C}$ . Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

Table 1  
*Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strains	Relevant genotypes	Reference
BY4742 (WT)	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	[50]
<i>rad1<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad1::kanMX4</i>	[50]
<i>rad2<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad2::kanMX4</i>	[50]
<i>rad10<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad10::kanMX4</i>	[50]
<i>rad14<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad14::kanMX4</i>	[50]
<i>rad4<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad4::kanMX4</i>	[50]
<i>rad52<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rad52::kanMX4</i>	[50]
<i>rev3<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>rev3::kanMX4</i>	[50]
<i>ogg1<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>ogg1::kanMX4</i>	[50]
<i>mag1<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>mag1::kanMX4</i>	[50]
<i>apn1<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>apn1::kanMX4</i>	[50]
<i>apn2<math>\Delta</math></i>	BY4742; with <i>apn2::kanMX4</i>	[50]
SJR751 (WT)	<i>MAT<math>\alpha</math>; ade2-101<math>_{oc}</math>; his3<math>\Delta</math>200; ura3<math>\Delta</math>Nco; lys2<math>\Delta</math>Bgl; leu2-R</i>	[24]
<i>ntg1<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2</i>	[44]
<i>ntg2<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg2::hisG</i>	[24]
<i>ntg1<math>\Delta</math>ntg2<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i>	[24]
<i>ntg1<math>\Delta</math>ntg2<math>\Delta</math>apn1<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1<math>\Delta</math>::HIS3</i>	[24]
<i>ntg1<math>\Delta</math>ntg2<math>\Delta</math>apn1<math>\Delta</math>rad52<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1<math>\Delta</math>::HIS3 rad52::URA3</i>	[24]
<i>ntg1<math>\Delta</math>ntg2<math>\Delta</math>apn1<math>\Delta</math>rad1<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG rad1::hisG apn1<math>\Delta</math>::HIS3</i>	[51]
<i>ntg1<math>\Delta</math>ntg2<math>\Delta</math>apn1<math>\Delta</math>rev3<math>\Delta</math></i>	SJR0751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG rad1::hisG apn1<math>\Delta</math>::HIS3 rev3::kanMX4</i>	[51]
XV185-14C	<i>MAT<math>\alpha</math>; ade2-2; arg4-17; his1-7; lys1-1; trp5-48; hom3-10</i>	[20]
XS2316	<i>MAT<math>\alpha</math>/<math>\alpha</math>; +<i>ade6; leu1-12/leu1-12; trp5-48/+; +cyh2; +met13; +lys5-1; his1-1/his1-1</i></i>	[52]

#### 2.4. Measurements of ET-743 induced canavanine resistance

Forward mutation to canavanine resistance was determined in strains proficient and deficient in DNA repair pathways [SJR751 (WT), *ntg1Δntg2Δ*, *ntg1Δntg2Δapn1Δ*, *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ*, *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*]. A suspension of  $2 \times 10^8$  LOG cells  $\text{mL}^{-1}$  was incubated for 6 h at 28 °C with different concentrations of ET-743. Survival was determined on SC and mutation induction on SC-Arg supplemented with 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  canavanine. Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

#### 2.5. Detection of ET-743-induced reverse and frameshift mutation

The haploid strain XV185-14C (Table 1) was used for assaying mutagenicity. A suspension of  $2 \times 10^8$  LOG cells  $\text{mL}^{-1}$  was incubated for 6 h at 28 °C with different concentrations of ET-743. The survival was determined on SC and mutation induction (*LYS*<sup>+</sup>, *HIS*<sup>+</sup> or *HOM*<sup>+</sup> revertants) on appropriate omission media. Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele and reversions result from mutations at the locus itself [21], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [22], which can be reverted either by locus-specific or by a forward mutation in a suppressor gene [20,22]. Distinction between true reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus was according to Schuller and Von Borstel [23], where the reduced adenine content of the medium SC-lys shows locus reversions as red and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [20]. Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

#### 2.6. Detection of induced mitotic recombination

A cell suspension ( $2 \times 10^6$  LOG cells  $\text{mL}^{-1}$ ) was incubated in PBS for 6 h at 28 °C with different concentrations of ET-743. After treatment, the cells were diluted in saline, plated on SC, SC-leu, and SC + cyh, followed by incubation at 28 °C. Colonies grown on SC medium yielded data of cell survival and colonies grown on SC-leu and SC + cyh were scored for intragenic recombination (gene conversion) and intergenic recombination (crossing-over), respectively. Assays were repeated at least three times and plates were done in triplicate for each dose.

### 3. Results

#### 3.1. Sensitivity of DNA repair-deficient yeast strains for ET-743

The *S. cerevisiae* BY4742 repair-proficient (WT) strain, was sensitive for ET-743 in a dose-dependent manner (Fig. 2A and B). On the other hand, as previously observed for *E. coli* and mammalian cells [14,18], the yeast *rad1Δ* and *rad2Δ* strains, which lack the 5'- and 3'-endonucleases of NER, showed an elevated resistance as compared to the isogenic WT strain (BY4742) with 60% of survival at the highest ET-743 dose against ~1.5% of survival of the WT (Fig. 2A). The *rad10Δ* (deficient in the 5'-endonuclease NER complex) and *rev3Δ* (which have a partially functional TLS pathway) mutants displayed both an intermediate sensitivity to high doses of ET-743 (20% and 22%, respectively; Fig. 2A). Mutants *rad4Δ* and *rad14Δ* had the same ET-743 sensitivity as the WT (Fig. 2A). Interestingly, the single mutant *rad52Δ* (HR pathway) also showed an elevated resistance (67%) as compared to the isogenic WT (Fig. 2A).

The single BER mutants had a remarkable resistance to ET-743 when compared to the WT (Fig. 2B). The BER

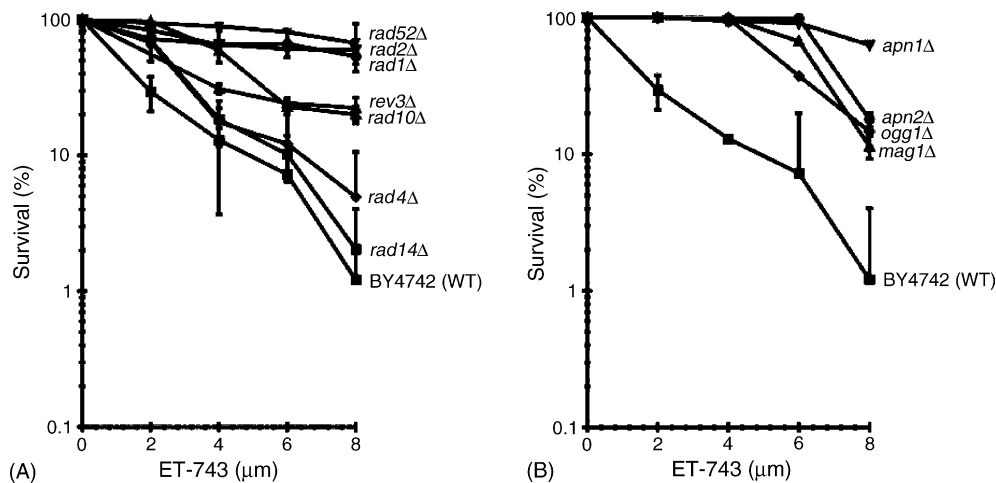


Fig. 2. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in (A) NER, HR and TLS, and (B) BER after treatment with different doses of ET-743 (0–8  $\mu\text{M}$ ). Error bars represent the standard deviations for three separately treated cultures.

endonuclease-deficient *apn1Δ* strain was the most resistant at all ET-743 doses tested, while the single mutants for DNA N-glycosylases/AP lyases (*ogg1Δ* and *mag1Δ*) and for BER endonuclease *apn2Δ* showed an intermediate sensitivity at the highest ET-743 dose (Fig. 2B).

To examine the overlapping functions of different DNA repair pathways, we tested yeast mutants lacking DNA repair proteins from NER, BER, recombination and/or TLS pathways. The ET-743 sensitivity of single (*ntg1Δ* and *ntg2Δ*), double (*ntg1Δntg2Δ*), triple (*ntg1Δntg2Δapn1Δ*) and quadruple (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ*, *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ*, and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*) mutants was tested using strains isogenic to the WT (SJR751). Although the SJR751 WT was more resistant to ET-743 than the BY4742 WT (22% against 1.5% of survival at 8 μM of ET-743, Fig. 4), the resistance pattern of all BER mutants was similar, as all had an elevated resistance to ET-743 (Fig. 3A and B).

Both single- (*ntg1Δ* and *ntg2Δ*) and double (*ntg1Δntg2Δ*) mutants displayed a similar WT-like sensitivity at highest doses of ET-743 (Fig. 3A), while the triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* had the same resistance of *apn1Δ* at 6 μM ET-743 (Fig. 4). At 8 μM of ET-743, both single- and triple mutants survived at 71% and 91%, respectively (Figs. 3A and 4). Interestingly, the quadruple mutants were more resistant than the SJR751 WT. Mutant strains *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* showed an intermediate resistance, while the strain *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* was significantly more ET-743 resistant (Fig. 3B).

### 3.2. Detection of ET-743 canavanine forward mutation

We investigated how ET-743 affected the induction of canavanine (CAN) forward mutations in the SJR751 (WT), double-, triple-, and quadruple mutants in comparison to the standard mutagen UVC (Table 2). With exception of the quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ*, all strains

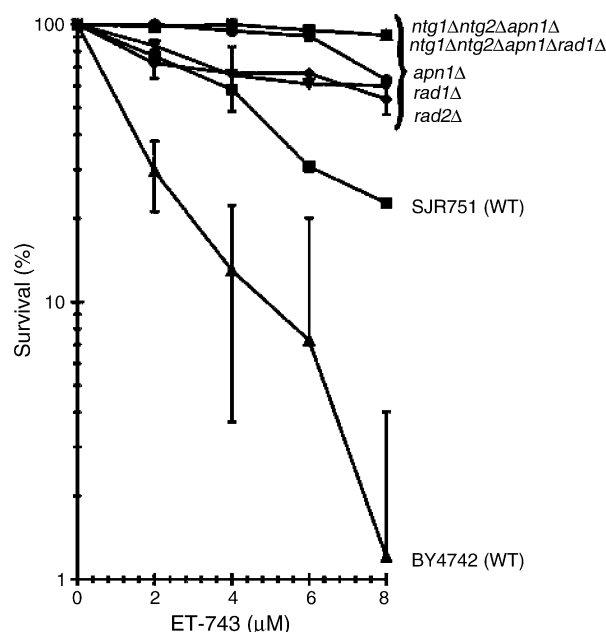


Fig. 4. Survival of *S. cerevisiae* single-, double-, and triple mutants of BER and NER pathways after treatment with different doses of ET-743 (0–8 μM). Error bars represent the standard deviations for three separately treated cultures.

tested showed a similar WT-like survival. As expected, the *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* strain has a strong UVC-induction of canavanine forward mutation. In this case, the elimination of two error-free DNA repair pathways (BER and NER) of the quadruple mutant may lead to an increase in either mutation or recombination rate after exposure to a mutagenic agent [24].

The SJR751 WT and *ntg1Δntg2Δ* strains showed similar sensitivity to 8 μM of ET-743, with both strains having a two- to five-fold elevated forward mutation induced by ET-743 (Table 2). The *ntg1Δntg2Δapn1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* mutants, which are resistant to ET-743 treatment (Table 2), also showed a significantly

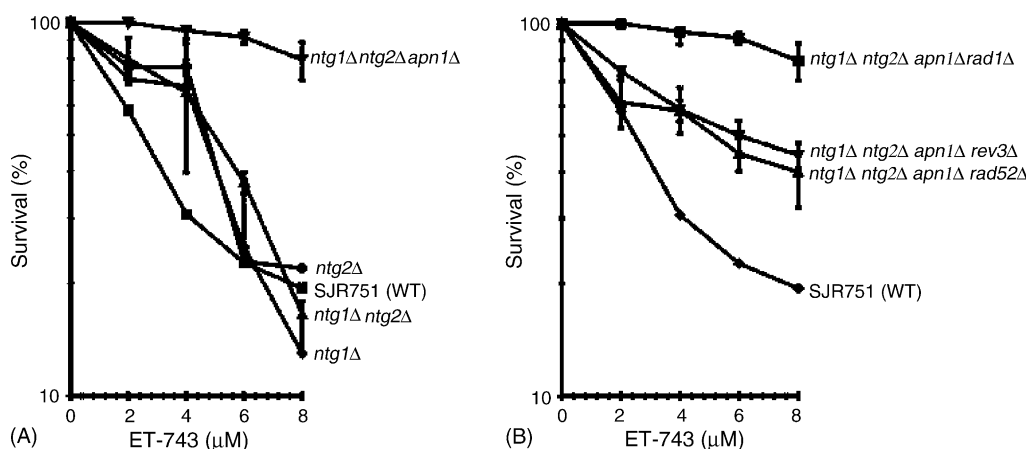


Fig. 3. Survival of *S. cerevisiae* (A) single-, double-, and triple-mutant BER strains and (B) quadruple mutants combining deficiencies in NER, BER, TLS, and HR after treatment with different doses of ET-743 (0–8 μM). Error bars represent the standard deviations for three separately treated cultures.

Table 2  
Induction of canavanine resistance (*canI<sup>r</sup>*) in WT and repair mutants of *S. cerevisiae* after ET-743 treatment

UVC (J/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Survival (%)	Can <sup>+</sup> /10 <sup>7</sup> survivors	ET-743 (μM)	Survival (%)	Can <sup>+</sup> /10 <sup>7</sup> survivors
<b>SJR751 (WT)</b>					
0	100.00 (704) <sup>b</sup>	2.67 ± 0.70 <sup>c</sup> (281) <sup>b</sup>	0	100.00 (704) <sup>b</sup>	2.67 ± 0.70 <sup>c</sup> (281) <sup>b</sup>
37	67.47 (475)	18.79 ± 2.60 <sup>**</sup> (891)	2	58.24 (410)	2.89 ± 0.8 (200)
56	39.20 (276)	43.43 ± 4.67 <sup>**</sup> (1199)	4	30.68 (216)	2.71 ± 1.49 (88)
			8	19.46 (137)	4.85 ± 1.83 <sup>*</sup> (99)
<b><i>ntg1Δntg2Δ</i></b>					
0	100.00 (459)	4.72 ± 0.38 (217)	0	100.00 (459)	4.72 ± 0.38 (217)
19	76.68 (352)	9.54 ± 2.03 <sup>*</sup> (335)	2	100.00 (517)	4.92 ± 0.63 (254)
37	60.13 (276)	16.34 ± 2.73 <sup>*</sup> (451)	4	73.85 (339)	5.28 ± 1.50 (179)
56	38.34 (176)	32.02 ± 2.73 <sup>**</sup> (563)	8	18.74 (86)	24.59 ± 2.97 <sup>**</sup> (211)
<b><i>ntg1Δntg2Δapn1Δ</i></b>					
0	100.00 (292)	50.56 ± 8.79 (443)	0	100.00 (536)	50.56 ± 8.79 <sup>b</sup> (443)
37	73.62 (215)	186.52 ± 39.51 <sup>**</sup> (1202)	2	100.00 (562)	52.51 ± 7.26 (1328)
56	53.43 (156)	259.39 ± 16.53 <sup>**</sup> (1214)	4	100.00 (651)	48.34 ± 10.35 (1414)
			8	92.16 (494)	111.29 ± 9.05 <sup>**</sup> (2474)
<b><i>ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ</i></b>					
0	100.00 (574)	46.94 ± 5.76 (269)	0	100.00 (505)	56.14 ± 16.89 (283)
6	17.59 (101)	163.69 ± 49.17 <sup>*</sup> (165)	2	100.00 (522)	19.73 ± 3.36 (103)
19	4.00 (23)	1,231.85 ± 7.19 <sup>*</sup> (284)	4	100.00 (532)	54.80 ± 12.07 (291)
			8	91.08(460)	119.38 ± 10.98 <sup>*</sup> (548)
<b><i>ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ</i></b>					
0	100.00 (872)	7.89 ± 2.13 (206)	0	100.00 (872)	7.89 ± 2.13 (206)
19	78.55 (685)	25.00 ± 8.84 <sup>*</sup> (513)	2	95.06 (829)	7.60 ± 2.61 (189)
37	66.05 (576)	55.34 ± 6.65 <sup>**</sup> (956)	4	58.94 (514)	8.05 ± 1.30 (124)
			8	37.38 (326)	8.13 ± 1.98 (79)
<b><i>ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ</i></b>					
0	100.00 (339)	140.40 ± 8.90 (476)	0	100.00 (339)	140.40 ± 8.90 (476)
19	100.00(354)	230.22 ± 9.44 <sup>**</sup> (815)	2	100.00 (362)	75.00 ± 11.21 (270)
37	67.55 (229)	440.35 ± 66.88 <sup>*</sup> (1004)	4	75.22 (255)	179.60 ± 38.38 (458)
			8	68.73 (233)	235.38 ± 15.74 <sup>**</sup> (548)

<sup>a</sup> Positive control.

<sup>b</sup> Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose.

<sup>c</sup> Standard deviation.

<sup>\*</sup> Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.05$  measured by Student's *t*-test.

<sup>\*\*</sup> Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.01$  measured by Student's *t*-test.

increased (>two-fold) mutation induction at all ET-743 doses tested. The quadruple mutants, containing the *rad52Δ* and *rev3Δ* mutations, responded differently in the CAN assay after treatment with ET-743, despite their

comparable survival at all doses used (Table 2). The ET-743 treatment in the *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* mutant was mutagenic while it was not in the *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* mutant.

Table 3  
Induction of point mutation (*his1-7*) ochre allele (*lys1-1*) and frameshift (*hom3-10*) mutations in haploid XV185-14C strain of *S. cerevisiae* after ET-743 treatment

Agent	Dose (J/m <sup>2</sup> )	Concentration (μM)	Survival (%)	Lys1/10 <sup>7</sup> survivors <sup>a</sup>	His1/10 <sup>7</sup> survivors <sup>b</sup>	Hom3/10 <sup>7</sup> survivors <sup>b</sup>
UVC <sup>c</sup>	0		100.0 (915) <sup>d</sup>	0.11 ± 0.00 <sup>e</sup> (3) <sup>d</sup>	2.29 ± 0.44 <sup>e</sup> (63) <sup>d</sup>	1.34 ± 0.27 <sup>e</sup> (37) <sup>d</sup>
	37		38.79 (355)	8.33 ± 2.61 <sup>*</sup> (89)	12.11 ± 6.66 <sup>*</sup> (129)	6.56 ± 2.07 <sup>*</sup> (70)
ET-743	0		100.0 (600)	0.16 ± 0.00 (3)	2.83 ± 1.67 (51)	0.80 ± 0.00 (15)
		1	73.33 (440)	0.45 ± 0.00 <sup>**</sup> (6)	4.35 ± 1.49 <sup>**</sup> (57)	0.76 ± 0.26 (10)
		2	44.33 (266)	0.59 ± 0.44 <sup>**</sup> (5)	10.50 ± 1.98 <sup>*</sup> (84)	3.00 ± 1.29 (24)
		4	32.33 (194)	1.33 ± 0.51 <sup>**</sup> (9)	10.80 ± 4.72 <sup>*</sup> (63)	5.46 ± 2.88 <sup>*</sup> (33)

<sup>a</sup> Locus non-specific revertants (forward mutations).

<sup>b</sup> Locus-specific revertants.

<sup>c</sup> Positive control.

<sup>d</sup> Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose.

<sup>e</sup> Standard deviation.

<sup>\*</sup> Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.05$  measured by Student's *t*-test.

<sup>\*\*</sup> Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.01$  measured by Student's *t*-test.

Table 4  
ET-743-induced crossing-over (+/*cyh*) and gene conversion (*leu1-1/leu1-12*) in diploid strain *S. cerevisiae* XS2316 after ET-743 treatment

Agent	Dose (J/m <sup>2</sup> )	Concentration(μM)	Survival (%)	Crossing-over/10 <sup>5</sup> survivors	Gene conversion/10 <sup>5</sup> survivors
UVC <sup>a</sup>	0		100.00 (329) <sup>b</sup>	14.70 ± 2.06 <sup>c</sup> (481) <sup>b</sup>	1.95 ± 0.45 <sup>c</sup> (64) <sup>b</sup>
	37		83.39 (276)	18.73 ± 1.19* (517)	11.74 ± 1.36** (324)
	56		27.05 (86)	60.35 ± 4.32* (507)	46.89 ± 8.55** (394)
ET-743		0	100.00 (295)	16.36 ± 2.293 (481)	2.17 ± 0.50 (64)
		1	100.00 (366)	10.35 ± 2.94* (379)	7.13 ± 0.53** (261)
		2	21.69 (64)	85.44 ± 10.03* (546)	51.48 ± 5.67** (329)
		4	11.80 (35)	112.34 ± 22.58* (728)	64.90 ± 4.71** (331)

<sup>a</sup> Positive control.

<sup>b</sup> Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose.

<sup>c</sup> Standard deviation.

\* Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.05$  measured by Student's *t*-test.

\*\* Significance level obtained in relation to the negative control with  $P \leq 0.01$  measured by Student's *t*-test.

### 3.3. Detection of ET-743-induced reverse mutation

The capacity of ET-743 to induce point or frameshift mutations was analyzed in *S. cerevisiae* strain XV185-14C (Table 3). Interestingly, ET-743 increased the frequencies of both point (*HIS1*<sup>+</sup>, *LYS1*<sup>+</sup>) and frameshift (*HOM3*<sup>+</sup>) mutations in LOG cells of XV185-14C. The frequency of point mutation for the *his1* locus increased 4 times compared to the control at 4 μM of ET-743. Frameshift mutations, as scored for the *hom3-10* locus, increased seven times after drug treatment. For *lys1-1* only suppressors (forward mutations) could be scored and induction was about eight-fold over the spontaneous level.

### 3.4. Detection of induced mitotic recombination

The recombinogenic effect of ET-743 was investigated in LOG cells of diploid XS2316 under non-growth (PBS) conditions (Table 4). ET-743 induced statistically significant (Student's *t*-test) recombinogenic events. The frequency of crossing-over (+/*cyh*) and mitotic gene conversion (*leu1-1/leu1-12*) increased 29 and 13 times after ET-743 treatment, respectively.

## 4. Discussion

ET-743 has an unique mechanism of action when compared to the classical antitumoral drugs currently used in therapy. [18,25]. The cytotoxic activities of ET-743 have been largely investigated in all tumor models, especially in adult soft tissue sarcomas (STSs), where it shows a remarkable efficiency. STSs belong to a rare, heterogeneous family of malignancies that can arise from mesenchymal lineages anywhere in the body. Currently, despite adequate control of the primary tumor, more than half of all patients die within 5 years of the primary diagnosis, as a result of widespread metastatic disease [5]. Inoperable or metastatic sarcomas of osseous origin, such as osteogenic and Ewing's sarcomas, are generally fatal, typically showing low responsiveness to chemo- or radio-therapy [5,26–

28]. The resistance of STSs to chemotherapy agents is due to the overexpression of several genes related to cell cycle control, cell maintenance, and DNA repair, like *XRCC1* [29–32]. The action of ET-743 on mammalian cells has been studied by several authors in more or less detail. One proposed mechanism of action involved ET-743 interaction with the transcription-coupled (TC) NER machinery [18]. TC-NER acts on the removal of lesions that distort the DNA double helix, interfere in base pairing, and block DNA duplication and transcription. Incision of damaged DNA in both yeast and humans utilizes the function of two endonucleases—Rad1p-Rad10p and Rad2p in yeast, and XPF-ERCC1 and XPG in humans. Rad1p and Rad10p form a tight complex [33,34], and genetic and biochemical studies with a *rad1* mutant allele, whose encoded protein failed to interact with Rad10p, provided strong evidence that complex formation was essential for the biological function of these proteins [33]. The Rad1p-Rad10p complex exhibits single-strand DNA endonuclease activity [35,36] that acts in a structure-specific manner and cleaves 5'-ended single stranded DNA at its junction with the duplex DNA. Yeast Rad2p and its human counterpart XPG also show a single-strand DNA endonuclease activity that cleaves the 3'-end at its junction with the duplex DNA [37]. These activities of Rad1p-Rad10p (XPF-ERCC1), and Rad2p (XPG) nucleases would also correctly incise ET-743 treated DNA on the 5' and 3' side of the damage, respectively [38]. Besides providing the endonucleolytic activities for dual incision, Rad1p-Rad10p and Rad2p are also involved in the proper assembly of the NER machinery at the damage site [39]. Our results indicate that the *rad1Δ*, *rad2Δ* and *rad10Δ* yeast mutants show increased resistance in comparison to the BY4742 (WT), *rad4Δ*, and *rad14Δ* strains after ET-743 treatment (Fig. 2A). Interestingly, it has been described that the presence of ET-743 adducts in transcribed genes blocks the TC-NER system by stalling the cleavage intermediates and producing lethal SSBs [18]. However, cells possess DNA repair mechanisms other than NER acting on lesions induced by physico-chemical agents. Base excision repair (BER) is one mechanism that, together with NER, removes modified



bases from DNA [40]. BER primarily involves the repair of small, helix non-distorting base lesions and abasic sites [41] and oxidative DNA damage is believed to be primarily repaired by this pathway [42]. There is considerable overlap between the BER and NER with respect to damage processing. For example, similar to BER, NER has been shown to be capable of processing oxidative lesions such as thymine glycol and 8-oxoguanine [40,43]. Also both BER and NER repair abasic sites [24] interact synergistically in repair of endogenous and exogenous oxidative DNA damage [44]. Our data indicate that BER enzymes, together with Rad1p-Rad10p and Rad2p, also recognize the DNA damage induced by ET-743. The ET-743 resistance of single mutant *apn1Δ* when compared to the WT cell demonstrates that this BER endonuclease probably participates in the cytotoxic potential of the drug (Fig. 2B). Apn1p is an enzyme endowed with multiple enzymatic activities that protect nuclear and mitochondrial DNA from the deleterious action of endogenous oxidative and alkylation DNA damage [40]. According to the classic model of BER in yeast, as in the most organisms, a damaged base is removed by a specific *N*-glycosylase and the resulting apurinic/apyrimidinic (AP) site is cleaved by an AP endonuclease [40]. Apn1p cleaves DNA at 5'-side of a regular or reduced AP site [45,46], while Apn2p is a back-up enzyme that accounts for only 10% of cellular AP endonuclease activity [47]. On the other hand, the strains defective for Apn2p, Ogg1p and Mag1p also show an elevated resistance when compared to the BY4742 (WT) strain for ET-743 doses of 2 and 4 μM (Fig. 2B), while the single and double *ntg1Δ* and *ntg2Δ* strains have similar SJR751 (WT)-sensitivity to the same ET-743 treatment (Fig. 3A). Ntg1p, Ntg2p, and Ogg1p are three DNA *N*-glycosylases endowed with an AP lyase activity [40]. Ntg1p and Ogg1p are both nuclear and mitochondrial proteins, whereas Ntg2p is exclusively nuclear [42]. Ntg1p and Ntg2p excise a variety of oxidized pyrimidines and formamido pyrimidines (FapyA and FapyG) [40], whereas Ogg1p excises 8-oxoG and FapyG [40]. Mag1p initiates BER of DNA alkylation damage by removing 3-MeA and other alkylated purines [40]. We think that Ntg1p and Ntg2p do not recognize the substrate generated by the intercalation of ET-743 into DNA. However, the partial resistance of Ogg1p and Mag1p indicates that these two DNA glycosylases can process ET-743 induced DNA lesions.

The resistance of triple mutant (*ntg1Δntg2Δapn1Δ*, Fig. 3A) to ET-743, which is a consequence of the Apn1p absence, does not occur in the double mutant *ntg1Δntg2Δ* (Fig. 3A). On the other hand, the quadruple mutants for BER/NER, BER/TLS and BER/REC show different sensitivities for ET-743 (Fig. 3B), with the strain deficient in both BER and NER having the highest resistance of all strains tested to ET-743. This could indicate that both DNA repair pathways are recruited for repair of ET-743-induced DNA lesions. It should be noted that in all mutants deficient for the major endonucleases of BER and NER

an epistatic interaction could be observed after ET-743 treatment (Fig. 4).

The increase of the frequency of forward mutation induced by ET-743 in the quadruple mutant blocked in both BER and NER (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ*) indicates that an error-prone pathway repairs (some of) the DNA lesions. This was confirmed when the quadruple mutant for BER and TLS, after ET-743 treatment, did not show induction of forward mutations. The *REV3* gene encodes the enzymatically active protein of DNA polymerase ζ (Pol zeta), a translesion enzyme that can bypass thymine dimers during replication in an error-prone manner by introducing any nucleotide in the sister strand [48]. Thus, the results of mutagenesis, also supported by the intermediate sensitivity of the single mutant *rev3Δ* (Fig. 2A) and the quadruple mutant for BER and TLS (Fig. 3B), show that other translesion enzymes, like Rad30p [DNA polymerase η (Pol eta)] contribute to the cell's ET-743 tolerance. The increase in the frequency of crossing-over show that the HR pathway (*RAD52* epistasis group) is necessary to keep the cell's viability after ET-743 treatment in the absence of a functional NER or BER pathways. But it should be noted that the single mutant *rad52Δ* showed a high degree of survival after treatment with different doses of ET-743 (Fig. 2A), corroborating the idea that an error-prone pathway, e.g. TLS, could be responsible for ET-743 tolerance. Moreover, the intermediate sensitivity of the quadruple mutant for BER and HR (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*, Fig. 3B), as well as the increase in the frequency of forward mutation suggest an interaction of different DNA repair pathways related to tolerance of ET-743 damage (Table 2).

Our results and those in the literature allow us to propose a most probable model of ET-743 action, which also explains its weakly mutagenic activity (Fig. 5). In *S. cerevisiae* WT cells the NER/BER repair systems recognize the DNA damage after treatment with ET-743, inducing the recruitment of specific endonucleases (e.g. Apn1p, Rad1p-Rad10p, and Rad2p). These complexes are trapped by the C subunit of ET-743, and thus form a covalently attached complex with DNA, stalling the DNA polymerase. The complexes are very cytotoxic and can induce cell death [16,18]. However, when cells lack the endonucleolytic components of BER and NER repair processing of the ET-743 damage is channeled to TLS (Fig. 5). In this case ET-743 induced damage is tolerated by TLS repair that generates insertion of any base or an abasic site directly opposite to the ET-743-induced DNA lesion. This damage could be then direct for two pathways, depending on the presence of proteins of homologous recombination (HR) system and/or TLS components: (1) HR associated to TLS (error-free) or (2) a second TLS, leading to mutant and WT phenotypes (error-prone). It has been described recently that the Mph1p acts in a post-replicative repair pathway in an error-free fashion, characterizing a branch of homologous recombination associated with TLS [49]. In the absence of Rev3p, the ET-743 damage could be tolerated

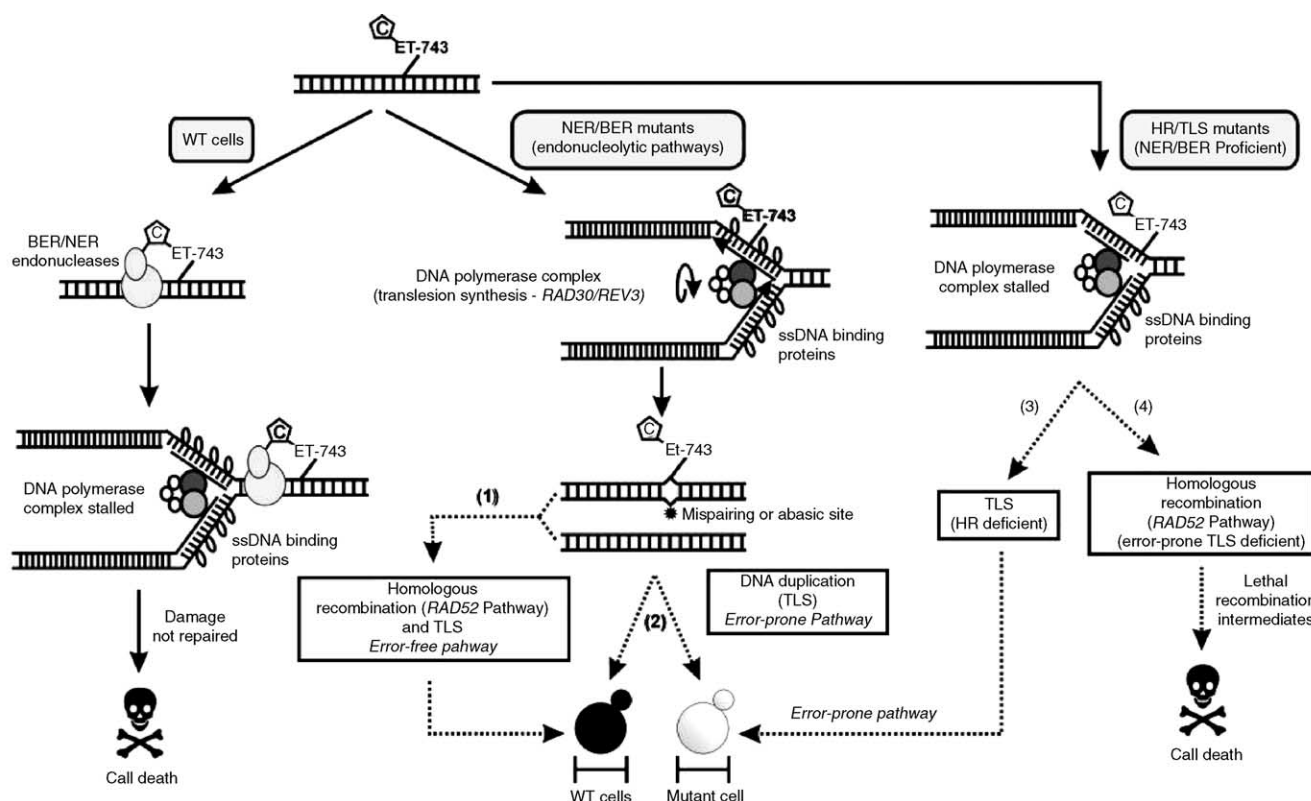


Fig. 5. Model proposed for ET-743 cytotoxicity in WT and mutant cells for DNA repair pathways. In WT, which has all NER and BER functional DNA endonucleases, the ET-743 binds covalently to the endonuclease proteins by means of tetrahydroisoquinoline ring (C subunit), while the A- and B-subunits of ET-743 provide the scaffold for DNA recognition and bonding. This complex represents a permanently bound structure that stalls the DNA polymerase complex, thus inducing cell cycle arrest or even cell death. On the other hand, in the BER and NER endonuclease-lacking mutant strains ET-743 damage can be tolerated by DNA polymerase  $\zeta$  (Rev3p) and  $\eta$  (Rad30p)-mediated translesion synthesis. In this case, mispairing or abasic sites originating from DNA replication opposite of the ET-743 adduct can be channeled to (1) homologous recombination associated to translesion synthesis (error-free pathway) in the absence of Rev3p or (2) DNA translesion synthesis (error-prone pathway), when Rad52p is not present. Otherwise, in the yeast strains defectives for HR or TLS but proficient for NER/BER pathways, an ET-743-stalled DNA replication fork could be tentatively repaired by (3) TLS in the absence of HR (Rad52p), resulting in cell survival, or (4) by HR when a TLS pathway (Rev3p) is not fully functional. In this last case, the recombinational products resulting from the action of NER/BER endonucleases plus HR proteins together with ET-743 are extremely genotoxic for the cell. Abbreviations: ssDNA binding proteins (single strand DNA binding proteins).

by a mechanism that combines HR with TLS catalyzed by Rad30p and Rad52p. This error-free pathway could act as a back-up repair system in absence of a fully functional TLS or when the cell is submitted to treatment with high doses of ET-743. On the other hand, the presence of an ET-743 adduct in DNA could induce the replication fork to stall, generating a signal that recruits proteins of HR or TLS pathways (Fig. 5). Many authors agree that a stalled replication fork in eukaryotes can be repaired by HR or by TLS [53–55], but the choose of which pathway will be used for restoring the replication fork is not fully understood [56]. The use of HR to repair stalled replication forks implies that endonucleases (e.g. Rad1p-Rad10p complex or Mus81p) are needed to resolve the intermediate DNA structures that arise during the recombinational process, like Holliday junctions [56,57]. Interestingly, it has been observed an interplay between HR and NER proteins during the repair of stalled replication forks induced by cisplatin in mammalian cells [58], which reinforces the idea that both pathways act together to deal with recom-

binational structures. Thus, our model proposes that the repair of a stalled replication fork by NER/BER and HR proteins, in the presence of an ET-743 adduct, probably results in toxic recombinational products that lead to cell death when an error-prone TLS pathway is not functional (Fig. 5). The partial resistance of single mutant *rev3Δ* could be also explained considering the action of error-free TLS polymerases, e.g. Rad30p. Moreover, the absence of a HR protein (e.g. Rad52p) channels the repair of stalled replication forks to a TLS pathway, resulting in cell survival and ET-743 tolerance (Fig. 5).

We are conducting more experiments in order to elucidate the role of BER in the repair of ET-743 induced DNA damage, especially in mammalian cells.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Martin Brendel for critical reading of manuscript. This work was supported by research grants

from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and GENOTOX (Laboratório de Genotoxicidade, UFRGS).

## References

- [1] Rinehart KL. Antitumor compounds from tunicates. *Med Res Rev* 2000;20(1):1–27.
- [2] Jimeno JM, Faircloth G, Cameron L, Meely K, Vega E, Gomez A, et al. Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: development of ecteinascidin-743 (ET-743). *Drugs Fut* 1996;21(11):1155–65.
- [3] Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn KW. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 1996;35(41):13303–9.
- [4] Minuzzo M, Marchini S, Brogginini M, Faircloth GT, D'Incalci M, Mantovani R. Interference of transcriptional activation by the anti-neoplastic drug ET-743. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6780–4.
- [5] Delalogue S, Yovine A, Taamma A, Riofrío M, Brain E, Raymond E, et al. Ecteinascidin 743: a marine-derived compound in advanced, pre-treated sarcoma patients—preliminary evidence of activity. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1248–55.
- [6] Ryan DP, Supko JG, Eder JP, Seiden MV, Demetri G, Lynch TJ, et al. Phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 administered as a 72-h continuous intravenous infusion in patients with solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2001;7(2):231–42.
- [7] Hill GC, Remers WA. Computer simulation of the binding of saframycin A to d(GATGCATC)2. *J Med Chem* 1990;34(7):8.
- [8] Rao K, Lown J. DNA sequences selectivities in the covalent bonding of antibiotic saframycins Mx1, Mx3, A, and S deduced from MPE-Fe(II) footprinting and exonuclease III stop assays. *Biochemistry* 1992;31(48):12076–82.
- [9] Moore BM, Seaman FC, Hurley LH. NMR-based model of an ecteinascidin 743-DNA adduct. *J Am Chem Soc* 1997;119(23): 5475–6.
- [10] D'Incalci M, Colombo T, Ubezio P, Nicoletti I, Giavazzi R, Erba E, et al. The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *Eur J Cancer* 2003;39(13):1920–6.
- [11] Sakai R, Jares-Erijman EA, Manzanares I, Silva-Elipse MV, Rinehart KL. Ecteinascidins: putative biosynthetic precursors and absolute stereochemistry. *J Am Chem Soc* 1996;118(38):9017–23.
- [12] Seaman FC, Hurley LH. Molecular basis for the DNA sequences selectivity of Ecteinascidin 736 and 743: evidence for the dominant hole of direct readout via hydrogen bonding. *J Am Chem Soc* 1998;120(50):13028–41.
- [13] Zewail-Foote M, Hurley LH. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that beds DNA toward the major groove. *J Med Chem* 1999;42(14):2493–7.
- [14] Zewail-Foote M, Li VS, Kohn H, Bearss D, Guzman M, Hurley LH. The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent. *Chem Biol* 2001;8(11):1033–49.
- [15] Martinez EJ, Owa T, Schreiber SL, Corey EJ. Phtalascidin a synthetic antitumor agent with potency and mode of action comparable to ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):3496–501.
- [16] Takebayashi Y, Pommier Y. DNA minor groove alkylation by ecteinascidin-743 (Et-743) induces sequence specific topoisomerase I mediated DNA damage. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:108.
- [17] Damia G, Silvestri S, Carrassa L, Filiberti L, Faircloth GT, Liberi G, et al. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA repair pathways. *Int J Cancer* 2001;92(4):583–8.
- [18] Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, et al. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 2001;7(8):961–6.
- [19] Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press, 1995.
- [20] Von Borstel RC, Cain KT, Steinberg CM. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics* 1971;69(1):17–27.
- [21] Snow R. Recombination in ultraviolet-sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1968;6:409–18.
- [22] Hawthorne DC, Mortimer RK. Super-suppressors in yeast. *Genetics* 1963;48:617–20.
- [23] Schuller RC, Von Borstel RC. Spontaneous mutability in yeast. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. *Mutat Res* 1974;24(1):17–23.
- [24] Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW, Jinks-Robertson S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999;19(4):2929–35.
- [25] Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, et al. Ecteinascidin 743 (ET-743), a natural marine compound with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 2001;37(1):97–105.
- [26] Hattori H, Kuroda M, Ishida T, Shinmura K, Nagai S, Mukai K, et al. Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma. *Pathol Int* 2004;54(1):26–31.
- [27] Santoro A, Tursz T, Mouridsen H, Verweij J, Steward W, Somers R, et al. Doxorubicin versus CYVADIC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas: A randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 1995;13(7):1537–45.
- [28] Demetri GD, Elias AD. Results of single-agent and combination chemotherapy for advanced soft tissue sarcomas. Implications for decision making in the clinic. *Hematol Oncol Clin N Am* 1995;9(4):765–85.
- [29] Levenson VV, Davidovich IA, Roninson IB. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Res* 2000;60(18):5027–30.
- [30] Cvijic ME, Chin KV. Effects of Rf $\alpha$  overexpression on cisplatin sensitivity in human ovarian carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(3):723–7.
- [31] Ohga T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagaki Y, Tanimoto M, et al. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996;56(18):4224–8.
- [32] Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, Bergmann S, Metzner S, Bommer K, et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic *MDR1* gene expression. *Nat Med* 1997;3(4):447–50.
- [33] Bailly V, Sommers CH, Sung P, Prakash L, Prakash S. Specific complex formation between proteins encoded by the yeast DNA repair and recombination genes *RAD1* and *RAD10*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8273–7.
- [34] Bardwell L, Cooper AJ, Friedberg EC. Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins *RAD1* and *RAD10* in vitro. *Mol Cell Biol* 1992;12(7):3041–9.
- [35] Tomkinson AE, Bardwell AJ, Bardwell L, Tappe NJ, Friedberg EC. Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature* 1993;362(6423): 860–2.

- [36] Sung P, Reynolds P, Prakash L, Prakash S. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD1–RAD10 endonuclease. *J Biol Chem* 1993;268(35):26391–9.
- [37] Harrington JJ, Lieber MR. Functional domains within *FEN-1* and *RAD2* define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1994;8(11):1344–55.
- [38] Prakash S, Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* 2000;451(1–2):13–24.
- [39] Guzder SN, Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S. Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 1995;270(22):12973–6.
- [40] Boiteux S, Guillet M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 2004;3(1):1–12.
- [41] Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999;286(5446):1897–905.
- [42] You HJ, Swanson RL, Harrington C, Corbett AH, Jinks-Robertson S, Senturker S, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: broad specificity *N*-glycosylases for the repair of oxidative DNA damage in the nucleus and mitochondria. *Biochemistry* 1999;38(35):11298–306.
- [43] Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(17):9463–8.
- [44] Gellon L, Barbey R, van der Kemp Auffret P, Thomas D, Boiteux S. Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 2001;265(6):1087–96.
- [45] Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994;63:915–48.
- [46] Johnson AW, Demple B. Yeast DNA diesterase for 3′-fragments of deoxyribose: purification and physical properties of a repair enzyme for oxidative DNA damage. *J Biol Chem* 1988;263(34):18009–16.
- [47] Unk I, Haracska L, Gomes XV, Burgers PM, Prakash L, Prakash S. Stimulation of 3′ → 5′ exonuclease and 3′-phosphodiesterase activities of yeast Apn2 by proliferating cell nuclear antigen. *Mol Cell Biol* 2002;22(18):6480–6.
- [48] Morrison A, Christensen RB, Alley J, Beck AK, Bernstine EG, Lemontt JF, et al. *REV3*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol* 1989;171(10):5659–67.
- [49] Schurer KA, Rudolph C, Ulrich HD, Kramer W. Yeast *MPH1* gene functions in an error-free DNA damage bypass pathway that requires genes from homologous recombination, but not from postreplicative repair. *Genetics* 2004;166(4):1673–86.
- [50] Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 1998;14(2):115–32.
- [51] Morey NJ, Doetsch PW, Jinks-Robertson S. Delineating the requirements for spontaneous DNA damage resistance pathways in genome maintenance and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2003;164(2):443–55.
- [52] Machida I, Nakai S. Differential effect of UV irradiation on induction of intragenic and intergenic recombination during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1980;73(1):69–79.
- [53] Johansson F, Lagerqvist A, Erixon K, Jenssen D. A method to monitor replication fork progression in mammalian cells: nucleotide excision repair enhances and homologous recombination delays elongation along damaged DNA. *Nucl Acids Res* 2004;32(20):e157.
- [54] Cleaver JE, Bartholomew J, Char D, Crowley E, Feeney L, Limoli CL. Polymerase eta and p53 jointly regulate cell survival, apoptosis and Mre11 recombination during S phase checkpoint arrest after UV irradiation. *DNA Repair* 2002;1(1):41–57.
- [55] Lehmann AR. Replication of UV-damaged DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. *Gene* 2000;253(1):1–12.
- [56] Barbour L, Xiao W. Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutat Res* 2003;532(1–2):137–55.
- [57] Bastin-Shanower SA, Fricke WM, Mullen JR, Brill SJ. The mechanism of Mus81–Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1–Rad10. *Mol Cell Biol* 2003;23(10):3487–96.
- [58] De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA. Defects in inter-strand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin. *Nucl Acids Res* 2002;30(17):3848–56.

# IV. CAPÍTULO 2

***REPLICATION AND HOMOLOGOUS RECOMBINATION REPAIR  
REGULATE DNA DOUBLE-STRAND BREAK FORMATION BY  
THE ANTITUMOR ALKYLATOR ECTEINASCIDIN 743***

***Proc Natl Acad Sci USA 104(32) : 13062-13067, 2007***

## APRESENTAÇÃO

Os interessantes resultados obtidos em células de levedura impulsionaram os estudos sobre o mecanismo de ação da ET-743 em células de mamíferos. Inicialmente, os dados sobre o envolvimento de diferentes vias de reparação de DNA na promoção da citotoxicidade e na tentativa de reparação dos danos gerados pela droga, conduziram-nos a estudar o processamento dos adutos de ET-743 no DNA.

Através da utilização de linhagens tumorais humanas e de linhagens celulares de mamíferos com deficiências em proteínas específicas, bem como, utilizando técnicas bioquímicas e moleculares disponíveis, foi possível propor um mecanismo para explicar como a lesão gerada pela ET-743 é processada.

Os resultados apresentados neste capítulo indicam que a ET-743 é capaz de gerar adutos que são fracamente reparados e são capazes de induzir lesões secundárias mesmo diversas horas após a exposição inicial à droga. As lesões secundárias geradas necessitam do sistema de recombinação homóloga para o reparo, e a perda deste sistema gera anomalias cromossômicas resultantes da extrema sensibilidade à droga.

Este estudo é suportado por um estudo clínico preliminar realizado com 92 pacientes portadores de sarcomas, onde o grupo que mostrou maior tempo de sobrevivência livre de progressão apresentava baixos níveis de expressão das proteínas de recombinação BRCA1/BRCA2.



## Mechanism of a marine alkaloid

The metallic glass transition

Late Permian mussel invasion

*Drosophila* memory gene

Detecting trisomy 21

# Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743

Daniele Grazziotin Soares<sup>\*†‡</sup>, Alexandre E. Escargueil<sup>\*</sup>, Virginie Poindessous<sup>\*</sup>, Alain Sarasin<sup>§</sup>, Aimery de Gramont<sup>\*</sup>, Diego Bonatto<sup>†‡</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>†‡</sup>, and Annette K. Larsen<sup>\*§¶</sup>

<sup>\*</sup>Group of Cancer Biology and Therapeutics, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 673, and Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France; <sup>†</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>‡</sup>Instituto de Biotecnologia e Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil; and <sup>§</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Formation de Recherche en Evolution 2939, and Université Paris-Sud, Institut Gustave-Roussy, Villejuif 94805, France

Edited by Gerald N. Wogan, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved April 23, 2007 (received for review November 7, 2006)

**Adducts induced by the antitumor alkylator ecteinascidin 743 (ET-743, Yondelis, trabectedin) represent a unique challenge to the DNA repair machinery because no pathway examined to date is able to remove the ET adducts, whereas cells deficient in nucleotide excision repair show increased resistance. We here describe the processing of the initial ET adducts into cytotoxic lesions and characterize the influence of cellular repair pathways on this process. Our findings show that exposure of proliferating mammalian cells to pharmacologically relevant concentrations of ET-743 is accompanied by rapid formation of DNA double-strand breaks (DSBs), as shown by the neutral comet assay and induction of focalized phosphorylated H2AX. The ET adducts are stable and can be converted into DSBs hours after the drug has been removed. Loss of homologous recombination repair has no influence on the initial levels of DSBs but is associated with the persistence of unrepaired DSBs after ET-743 is removed, resulting in extensive chromosomal abnormalities and pronounced sensitivity to the drug. In comparison, loss of nonhomologous end-joining had only modest effect on the sensitivity. The identification of DSB formation as a key step in the processing of ET-743 lesions represents a novel mechanism of action for the drug that is in agreement with its unusual potency. Because loss of repair proteins is common in human tumors, expression levels of selected repair factors may be useful in identifying patients particularly likely to benefit, or not, from treatment with ET-743.**

cancer therapy | natural products | lesion processing | DNA repair | response prediction

Compounds forming covalent DNA adducts (hereafter named DNA alkylators) are currently included in virtually all clinical drug regimens for the treatment of both leukemias and solid tumors. Lately, this group of compounds has attracted renewed interest because of the introduction of a novel class of antitumor agents with potent/unusual clinical activities, comprised of monofunctional DNA alkylators derived from natural sources. This group includes ecteinascidin-743 (ET-743, Yondelis, trabectedin), irifolven, hedamycin, and the acronycine derivative S23906. Mechanistic studies have revealed several differences in the way these compounds react with DNA-metabolizing enzymes as well as with the repair machinery (1–11), which could, at least in part, explain their different activity spectra. A better understanding of the factors controlling the induction and removal of DNA damage induced by these compounds should not only facilitate their clinical application, but may also contribute to our general understanding of the structural and biological features governing adduct processing in mammalian cells.

ET-743 has been subject to particular scrutiny linked to its source, clinical activity, and molecular mechanisms. ET-743 is a tetrahydroisoquinoline alkaloid isolated from the Caribbean sea squirt *Ecteinascidia turbinata* (12), pointing to marine products as a

potential new source of molecules with original chemical structures and activities. ET-743 shows a broad activity spectrum toward tumor cell lines at pM and low nM concentrations (6, 13) and has clinical activity toward ovarian cancer as well as soft tissue and bone sarcomas in heavily pretreated patients (14–16). In particular, ET-743 treatment is associated with a striking, long-term response in a subset of patients with otherwise chemoresistant soft tissue sarcomas (reviewed in ref. 17).

ET-743 binds to the minor groove of DNA with preference for GC-rich triplets and subsequently forms covalent adducts with the N2-position of guanine through its carbinolamine moiety (18). As a result, the minor groove is opened up and bended toward the major groove (19). The direction of bending is a novel feature among DNA minor groove-interactive agents, making ET-743 unique.

A particularly interesting aspect of the ET adducts is their interaction with cellular DNA repair pathways. ET lesions are not recognized by the global genome protein XPC but are recognized by transcription-coupled nucleotide excision repair (NER) as well as by proteins involved in the common NER pathway (1–3). Mammalian cells deficient in NER proteins such as the XPD and XPB helicases, and the XPG and ERCC1/XPF endonucleases showed 2- to 8-fold increased resistance to ET-743 in comparison with repair-proficient WT cells (1–3). Increased resistance to ET-743 was also reported for yeast mutants lacking the APN1 endonuclease, which particularly is involved in base excision repair (20). The unusual effect of these repair proteins on the cytotoxicity of ET-743 has been explained by the stabilization of repair complexes by the ET adducts (1–4, 21). Mismatch repair status had no detectable influence on the sensitivity to ET-743 (2, 6) whereas loss of the DNA-dependent kinase (DNA-PK) was reported to sensitize cells to ET-743 (2). Conflicting data have been reported for proteins involved in homologous recombination (HR) repair, because loss of repair function was associated with increased resistance to ET-743 in *Saccharomyces cerevisiae* (20) but increased sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe* (21).

Although it is widely believed that the cytotoxic activity of ET-743 is based on its interaction with the NER machinery

Author contributions: D.G.S. and A.E.E. contributed equally to this work; D.G.S., A.E.E., A.S., and A.K.L. designed research; D.G.S., A.E.E., and V.P. performed research; V.P. contributed new reagents/analytic tools; D.G.S., A.E.E., A.S., A.d.G., D.B., J.A.P.H., and A.K.L. analyzed data; and A.K.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

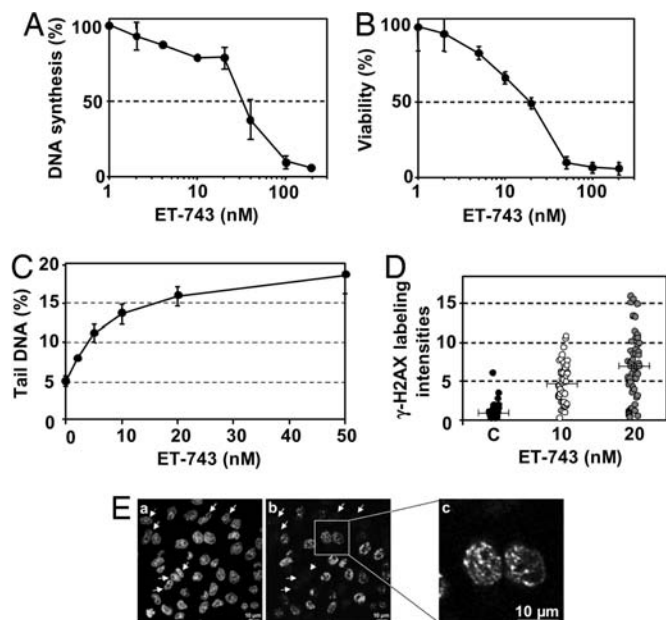
Abbreviations: DSB, double-strand break; HR, homologous recombination; NER, nucleotide excision repair; DNA-PK, DNA-dependent kinase.

<sup>¶</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: akraghlarlsen@aol.com.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0609877104/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0609877104/DC1).

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA





**Fig. 1.** Influence of ET-743 on DNA synthesis, cellular survival, and DSB formation. (A) HeLa cells were incubated with the indicated concentrations of ET-743 for 1 h, and the influence on DNA synthesis was measured by incorporation of radiolabeled thymidine. (B) HeLa cells were exposed to ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for four doubling times and the MTT viability assay. (C) HeLa cells were incubated with the indicated concentrations of ET-743 for 1 h, and the formation of DSBs was determined by the neutral comet assay. The points indicate the average amounts of DNA in the comet tail. Error bars represent standard errors and are indicated when they exceed the symbol size. (D) Cells were incubated with the indicated concentrations of ET-743 for 1 h, and the formation of  $\gamma$ -H2AX foci was revealed by immunostaining. Total fluorescent intensities were determined by MetaMorph image analysis. Each point represents the  $\gamma$ -H2AX staining in an individual cell. Bars represent the average fluorescence intensities. (E) Confocal fluorescence microscopy of nuclear DNA (a) and  $\gamma$ -H2AX (b and c). Cells were incubated with 10 nM ET-743 for 1 h, fixed, and labeled with a  $\gamma$ -H2AX-directed antibody. DNA was counterstained with Topro-3. Arrows indicate cells with no detectable  $\gamma$ -H2AX signal.

(reviewed in ref. 17), the high residual activity of the drug toward NER-deficient cells as well as the rather modest resistance levels (2- to 8-fold) suggest that this cannot be the only mechanism of action of ET-743. We speculated that the ET adducts would be unusually stable because of the absence of DNA repair and thus able to interfere with the replication machinery whenever the treated cells entered S phase, possibly triggering the formation of secondary DNA lesions with increased toxicity.

We here report that exposure to pharmacologically relevant concentrations of ET-743 is associated with the induction of replication-dependent double-strand breaks (DSBs). Cells deficient for HR repair showed pronounced sensitivity to the drug due to the continued presence of unrepaired DSBs that gave rise to chromosomal abnormalities. Our findings characterize the processing of the monofunctional ET adducts into cytotoxic lesions and identify replication and HR repair as key modulators of the cellular activity of this unique compound.

## Results

### ET-743 Exposure Is Associated with Potent Inhibition of DNA Synthesis.

To establish whether unrepaired ET adducts affect DNA synthesis, the influence of ET-743 on the incorporation of radiolabeled thymidine was determined. The results indicate that DNA synthesis is reduced by 50% after 1-h exposure to 30 nM ET-743 (Fig. 1A). Next, cells were exposed to ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for four cell doubling times, and the

cellular viability was determined by the MTT assay (Fig. 1B). The results show that the cellular viability is reduced by 50% after exposure to 20 nM ET-743. Therefore, inhibition of DNA synthesis and loss of cellular viability take place within the same dose range.

### ET-743 Exposure Is Associated with a Dose-Dependent Formation of DNA DSBs.

Single-cell electrophoresis under neutral conditions (the neutral comet assay), which almost uniquely detects DSBs (22, 23), was used to determine whether ET-743 exposure is accompanied by formation of DNA strand breaks. The results (Fig. 1C) show that 1-h exposure of HeLa cells to ET-743 was associated with a dose-dependent increase in DSBs, which could be detected at doses as low as 2 nM. The rapid formation of DSBs indicates that they are a direct result of drug action and not due to apoptotic DNA fragmentation. In agreement, exposure to 10 nM ET-743 for up to 24 h was not accompanied by any detectable increase in the fraction of apoptotic cells as determined by annexin V labeling (data not shown).

### ET-743 Exposure Is Accompanied by $\gamma$ -H2AX Formation.

The formation of phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) is considered as a sensitive surrogate marker for the formation of DSBs. Cells were exposed to ET-743 for 1 h followed by immunostaining with a  $\gamma$ -H2AX-directed antibody. The results show that ET-743 exposure is accompanied by a dose-dependent increase in  $\gamma$ -H2AX formation [Fig. 1D and supporting information (SI) Fig. 5]. Interestingly, focalized  $\gamma$ -H2AX staining was observed only in a subset of the cell population, indicating a possible role of the cell cycle (Fig. 1E, compare a and b; arrows indicate cells without  $\gamma$ -H2AX staining). ET-associated induction of  $\gamma$ -H2AX was observed in all cell lines examined, including HeLa cells, Chinese hamster cells, and CEM human leukemia cells (data not shown).

### Influence of DNA and RNA Synthesis.

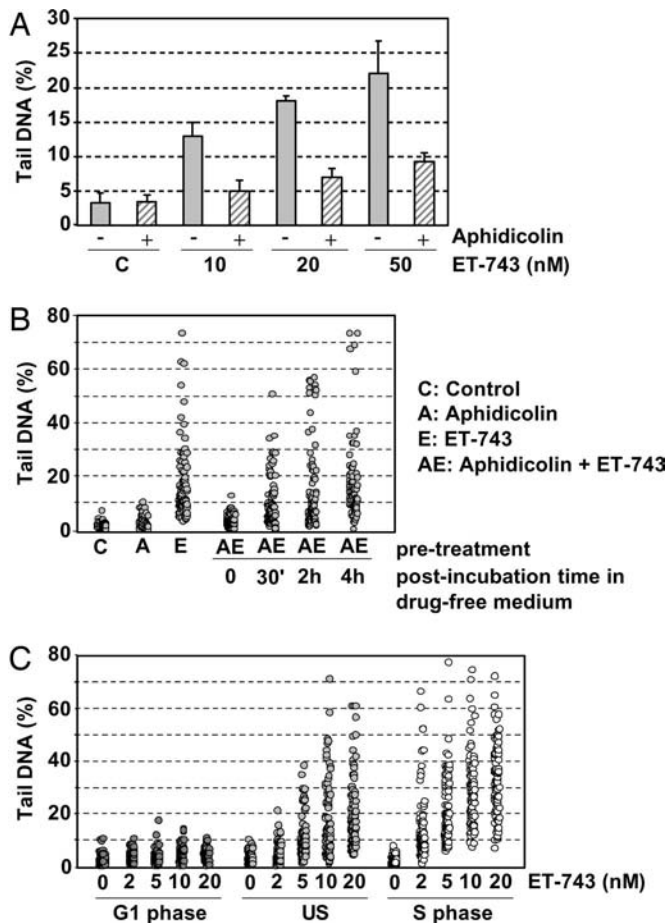
To determine whether the ET-induced DSBs were linked to macromolecular synthesis, HeLa cells were first incubated with different doses of ET-743 in the absence or presence of aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor. The results show that aphidicolin substantially reduced the induction of DSBs even at doses as high as 50 nM ET-743 (Fig. 2A). In contrast, 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole, a selective inhibitor of RNA polymerase II, had no detectable influence on the formation of DSBs (data not shown).

To further characterize the role of DNA synthesis, HeLa cells were incubated with ET-743 in the presence of aphidicolin for 1 h followed by postincubation in drug-free media for 4 h (Fig. 2B). The results show that reinitiation of DNA synthesis during the postincubation period, as determined by incorporation of radiolabeled thymidine (data not shown), was accompanied by a gradual formation of DSBs. By 4 h after incubation, the DNA synthesis had recovered totally and the levels of DSBs had reached approximately the same levels as observed after 1 h in the presence of ET-743 alone. These results clearly indicate that the formation of ET-induced DSBs strongly, if not entirely, depends on active DNA synthesis. The results also suggest that even brief exposure to ET-743 results in the formation of long-lasting ET adducts, which are difficult to repair and can be converted into DSBs later.

### ET-743-Mediated DNA Damage in Synchronized Cells.

To further confirm the role of DNA synthesis in the formation of DSBs, nonproliferating lymphocytes (that are in the  $G_0$  phase of the cell cycle) were isolated from the peripheral venous blood of healthy donors and exposed to ET-743. The results showed no formation of DNA strand breaks, even at doses as high as 100 nM ET-743 as determined by the highly sensitive alkaline comet assay, in marked contrast to what was observed for cycling CEM lymphoblastic leukemia cells (SI Fig. 6).

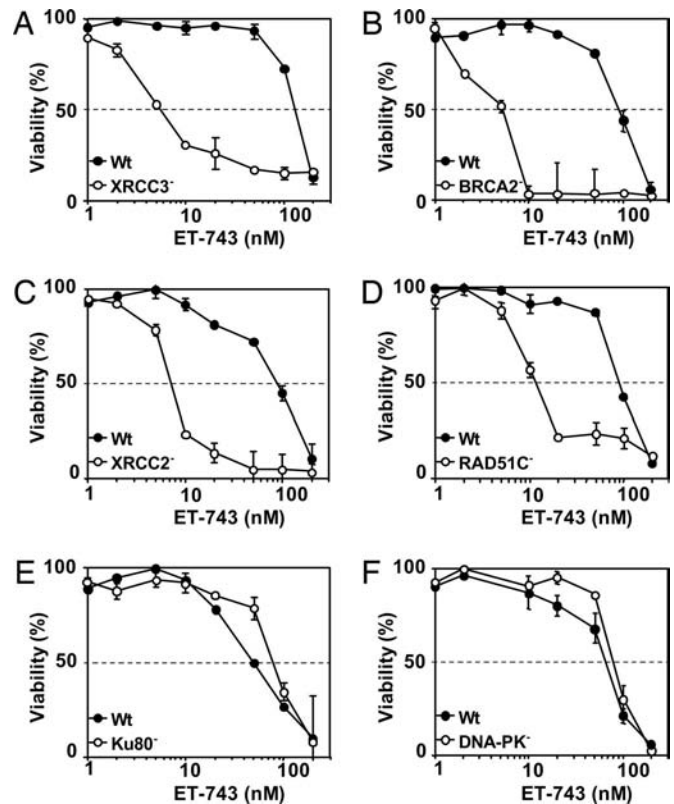
Next, the influence of ET-743 toward unsynchronized,  $G_1$ -synchronized, or S-synchronized HeLa cells was compared. The



**Fig. 2.** The formation of secondary DNA damage after ET-743 exposure. (A) HeLa cells were incubated with the indicated concentrations of ET-743 in the absence (filled bars) or presence (hatched bars) of aphidicolin ( $5 \mu\text{M}$ ). The values indicate the average amounts of DNA in the comet tail from at least two experiments. Error bars represent standard errors. (B) HeLa cells were incubated with  $10 \text{ nM}$  ET-743 for 1 h in the absence or presence of aphidicolin followed by postincubation in drug-free media for the indicated times. Each point represents the amount of tail DNA in an individual cell from a typical experiment. (C)  $G_1$ -synchronized, unsynchronized (US), or S-phase synchronized HeLa cells were exposed to the indicated concentrations of ET-743 followed by comet analysis. Each point represents the amount of tail DNA in an individual cell from a typical experiment.

average levels of DNA damage in ET-exposed  $G_1$  cells were comparable to those of untreated control cells (Fig. 2C). In clear contrast, ET exposure of cells synchronized in the S phase of the cell cycle was accompanied by significantly higher levels of DNA damage compared with unsynchronized cells ( $P \leq 0.05$  as determined by Student's *t* test).

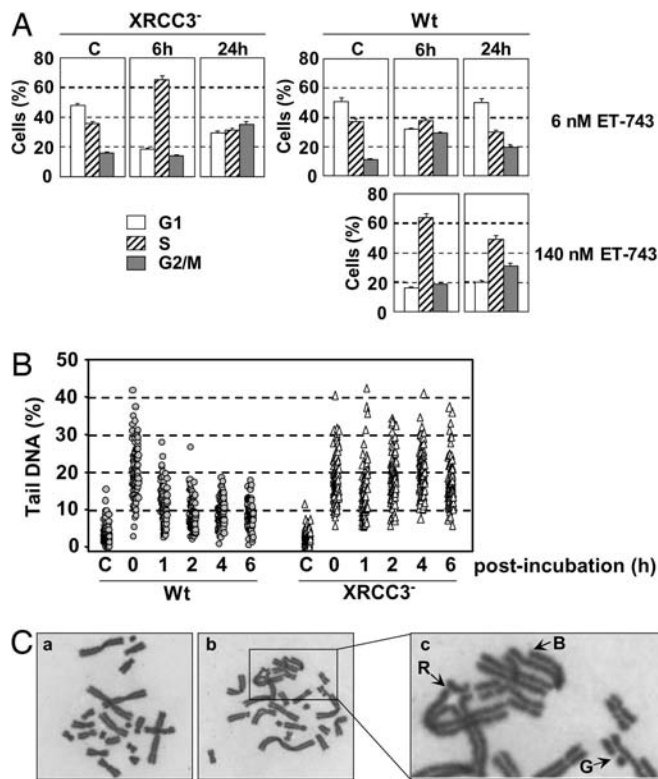
**Cytotoxicity of ET-743 Toward Cells Deficient in Recombination Repair.** DSBs can be repaired by two major pathways, HR, which is active during S and  $G_2$ , and nonhomologous end joining, which is preferentially active during the  $G_0/G_1$  phase of the cell cycle. To determine the importance of the two repair pathways, the cytotoxicity of ET-743 toward cell lines deficient for HR (RAD51C, XRCC2, XRCC3, and BRCA2) or nonhomologous end-joining (Ku80 and DNA-PK) and their respective repair-proficient parental cell lines was established. The results show that cells deficient for XRCC3, BRCA2, RAD51C, and XRCC2 were 23-, 18-, 8-, and 8-fold more sensitive to ET-743, respectively, compared with the corresponding repair-proficient parental cell lines (Fig. 3A–D). In



**Fig. 3.** Cytotoxic effects of ET-743 toward recombination-deficient cells. Recombination-proficient and -deficient cells were exposed to ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for four generation times, and the viability was determined by the MTT assay. (A) Filled circles, AA8 parental cells; open circles, *irs1SF* (XRCC3<sup>-</sup>). (B) Filled circles, V79 parental cells; open circles, V-C8 (BRCA2/XRCC11/FANCD1<sup>-</sup>). (C) Filled circles, V79B parental cells; open circles, CL-V4B (RAD51C<sup>-</sup>). (D) Filled circles, V79 parental cells; open circles, *irs1* (XRCC2<sup>-</sup>). (E) Filled circles, V79B parental cells; open circles, XR-V15B (Ku80/XRCC5<sup>-</sup>). (F) Filled circles, M059J Fus1 (DNA-PK-proficient); open circles, M059J Fus9 (DNA-PK-deficient). Each point represents the average of at least two independent experiments, each done in duplicate. Error bars represent standard errors and are indicated when they exceed the symbol size.

contrast, deficiencies in Ku80 and DNA-PK had minor influence on the sensitivity to ET-743 (Fig. 3E and F).

**Cell Cycle Progression in XRCC3-Proficient and -Deficient Cells.** To characterize the influence of ET-743 on HR-deficient cells, WT AA8 and XRCC3-deficient *irs1SF* cells were treated with different doses of ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for the indicated times (Fig. 4A). The results show that exposure of *irs1SF* cells to  $6 \text{ nM}$  ET-743 (corresponding to the  $\text{IC}_{50}$  dose determined in Fig. 3A) was accompanied by a dramatic enrichment of cells in the S phase of the cell cycle, which increased from 36% in untreated controls to 65% 6 h after incubation, suggesting rapid activation of the inter-S phase checkpoint. By 24 h after incubation, the most notable feature was a strong accumulation of cells in  $G_2/M$  representing 35% of the cells compared with 13% for the untreated control cells. In contrast, exposure of parental AA8 cells to the same dose of ET-743 was not associated with any detectable effect on S-phase progression during the first 6 h (Fig. 4A and data not shown) whereas the fraction of cells in the  $G_2/M$  phase of the cell cycle was enriched by 6 h and, to a lesser degree, by 24 h. Interestingly, exposure of AA8 cells to  $140 \text{ nM}$  ET-743 (corresponding to the  $\text{IC}_{50}$  dose) was associated with notable changes in both S phase and  $G_2$  phase progression, which closely resembled the changes observed at isotoxic doses for *irs1SF*.



**Fig. 4.** Influence of ET-743 on HR-proficient and -deficient cells. (A) Cell cycle distribution in AA8 (WT) and *irs15F* (XRCC3<sup>-</sup>) cells exposed to the indicated concentrations of ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for the indicated times. The IC<sub>50</sub> value for *irs15F* was 6 nM, and the isotoxic dose was 140 nM for AA8. (B) Repair of ET-induced DSBs in WT and XRCC3-deficient cells. Parental AA8 and XRCC3-deficient *irs15F* cells were exposed to 100 nM ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for the indicated times and determination of DNA strand breaks by the neutral comet assay. Each point represents the amount of tail DNA in an individual cell from a typical experiment. (C) Karyotypes of V79 cells. (a) Typical metaphase in untreated V79 cells. (b and c) V79 cells treated with 100 nM ET-743 for 1 h followed by 24 h of postincubation in drug-free media. The arrows indicate chromatid gaps (G), breaks (B), or radials (R).

These results show that, although ET-743 induced comparable cell cycle effects in HR-proficient and -deficient cells at isotoxic concentrations, induction of a marked S-phase arrest at low drug concentrations was restricted to the XRCC3-deficient cells.

**Formation and Removal of DSBs in XRCC3-Proficient and -Deficient Cells.** Next, WT and XRCC3-deficient cells were exposed to 100 nM ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media and

comet analysis. The results (Fig. 4B) show that 1 h of exposure to ET-743 was accompanied by the induction of comparable levels of DNA strand breaks in parental and XRCC3-deficient cells, with the average levels of DNA in the comet tail being 20% for the WT cells compared with 19% for the XRCC3-deficient cells. However, striking differences between the two cell lines were revealed during the postincubation period. The DSBs were effectively repaired in the parental cells, where the average levels of DNA in the comet were reduced from 20% to 11% after 1 h and to 8% 6 h after incubation. In comparison, no repair was observed for the XRCC3-deficient cells, where the average levels of DNA in the comet remained  $\approx$ 17% even 6 h after incubation. Therefore, the pronounced sensitivity of XRCC3-deficient cells to ET-743 (Fig. 3A) was associated with the persistence of unrepaired DSBs.

**Induction of Chromosome Damage in BRCA2-Deficient Cells.** Unrepaired DSBs may lead to chromosomal abnormalities. To determine the influence of HR repair on the karyotype of ET-treated cells, BRCA2-proficient and -deficient cells were exposed to different doses of ET-743 for 1 h followed by postincubation in drug-free media for 24 h and karyotype analysis (Table 1). BRCA2-deficient cells were preferred for these studies because they, in contrast to their XRCC3-deficient counterparts, are readily amenable to karyotype analysis. ET exposure of BRCA2-deficient cells was accompanied by a dose-dependent increase in the number of cells showing chromosome aberrations with the most common aberrations being chromatid breaks, gaps, and fragments. At 10 nM ET-743, all metaphases examined showed at least three chromosome aberrations (Table 1).

In contrast to the BRCA2-deficient cells, exposure of repair-proficient parental cells to 10 nM ET-743 was associated with chromosome abnormalities in only 1% of the cells (Table 1), in agreement with the ability of HR-proficient cells to repair the ET-induced DSBs (Fig. 4B). At higher doses,  $\approx$ 50% of the observed metaphases showed chromosome aberrations (Fig. 4C) of the same type as observed for the BRCA2-deficient cells. However, even at elevated doses, only some metaphases showed chromosome aberrations, in striking contrast to the highly damaged chromosomes observed for BRCA2-deficient cells at equitoxic doses (Table 1).

## Discussion

In this article we establish a mechanistic link between the initial ET adducts and the subsequent downstream events leading to cell death and identify replication and HR as important modulators of ET action.

ET-743 forms monofunctional adducts with the exocyclic amino group of guanine in the minor groove of DNA (18). The results presented here indicate that the ET adducts are poorly repaired and are able to induce secondary DNA damage even a long time after

**Table 1.** Analysis of chromosome aberrations in repair-proficient V79 parental cells and BRCA2-deficient V-C8 cells after 1 h of exposure to ET-743 followed by 24 h of postincubation in drug-free media

ET-743, nM	WT			BRCA2 <sup>-</sup>		
	Undamaged chromosomes	Damaged chromosomes	End-to-end association or radials	Undamaged chromosomes	Damaged chromosomes	End-to-end association or radials
0	100	0	0	97	3	0
1				86	14	1
2				58	42	1
5				10	90	2
10	99	1	0	0	100	3
50	50	50	27			
100	43	57	24			

One hundred metaphases per treatment condition were evaluated.

the initial drug exposure. Unrepaired adducts led to formation of DSBs as determined by single-cell electrophoresis under neutral conditions and by  $\gamma$ -H2AX induction. Interestingly,  $\gamma$ -H2AX staining was completely absent in some cells, suggesting a role for the cell cycle in the formation of the ET-induced DSBs. In agreement, no DNA strand breaks were observed in resting lymphocytes or in cells synchronized in G<sub>1</sub>, whereas cells synchronized in S showed increased levels of DSBs. These findings suggest a strict requirement for DNA synthesis in the formation of the ET-induced DSBs.

The formation of secondary DNA lesions in term of DSBs is not restricted to ET-743 but has previously been described for a number of other DNA-interacting agents including the DNA cross-linking agent mitomycin C (24) and the monofunctional DNA alkylator S23906 (11) and in NER-deficient cells after UV radiation (25) and is believed to occur when the advancing DNA replication fork runs into the DNA adducts. ET-induced DSBs were accompanied by the formation of focalized  $\gamma$ -H2AX, which is believed to promote the assembly of HR repair complexes around the DSB (26, 27). Mammalian cells deficient in HR showed pronounced sensitivity to ET-743 whereas nonhomologous end joining repair had minor influence on the sensitivity to ET-743. Although the relation between DNA synthesis and HR is well established (for recent review, see ref. 28), their respective links to DSB formation is more ambiguous, and several possibilities have been suggested. First, we might have a sequential model where the DSBs are created by the replication fork (or its collapse) thereby triggering HR. In this case we would expect little, if any, differences in the initial levels of DSBs between HR-proficient or -deficient cells. Second, HR might be needed to prevent replication fork collapse and to promote replication restart. In this case we would expect more initial levels of DSBs in HR-deficient cells. Third, the DSBs may be reaction intermediates formed during the recombination process that had become activated by the stalled replication forks. In this case we would expect more initial levels of DSBs in HR-proficient cells. Our experimental results provide clear evidence in favor of the first model. Strikingly, although HR status had little, if any, influence on the initial levels of DSBs after short exposure to ET-743, marked differences were revealed during the postincubation period, where no detectable repair was observed in the HR-deficient cells. The prolonged presence of unrepaired DSBs was followed by the appearance of mitotic chromosomes with chromatid aberrations in terms of gaps and breaks, in agreement with the S-phase-dependent induction of DSBs.

Previous studies showed that the ET adducts were recognized by transcription-coupled NER, a process that is triggered by arrest of the elongating RNA polymerase II by the DNA adducts. Surprisingly, 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole, a selective RNA polymerase II inhibitor, showed no detectable influence on the formation of ET-induced DSBs, suggesting that RNA synthesis does not contribute to DSB formation. Intriguingly, similar findings have previously been reported for mitomycin C, another DNA minor groove binder (29) associated with the formation of replication-dependent DSBs (24).

HR appears to be at least as important as NER in terms of modulating the response to ET, positively or negatively. Findings with mammalian repair mutants indicate that loss of NER function was associated with 2- to 8-fold increased resistance (1–3), whereas loss of proteins needed for HR repair was accompanied by 8- to 23-fold increased sensitivity (this study). The substantial residual activity of ET-743 toward NER-deficient cells suggests that the effects of NER and HR repair are, at least in part, independent events. In agreement, we observed a dose-dependent formation of DSBs in XPG-CS-deficient cells, which are deficient in both transcription-coupled NER and the common NER pathway (SI Fig. 7). In comparison, the levels of ET-induced DSBs were only slightly higher in repair-proficient WT and XPC cells, indicating that the putative DNA/ET/NER complexes are unlikely to be a major contributor to the formation of DSBs.

The conversion of the ET adducts into DSBs may, at least in part, be explained by the influence of the adducts on the properties of the local duplex DNA. Biochemical evidence as well as molecular modeling studies suggest that the ET adducts strongly stabilize the helical structure of duplex DNA, which is likely to slow down DNA separation during macromolecular synthesis (30, 31). In agreement, ET adducts were shown to strongly hamper DNA unwinding by the RecBCD helicase (9). These findings suggest that ET-743 may have functional similarities to cross-linking agents like mitomycin C, an established inducer of replication-dependent DSBs (24).

The important influence of different DNA repair pathways on the cytotoxic activity of ET-743 indicates that DNA repair functionality may be useful to assist in selection of the patients most likely to benefit from treatment with ET-743. This notion is supported by a preliminary clinical study with 92 sarcoma patients.<sup>||</sup> This study reports that ET-treated patients could be divided into three subgroups: one group responding with long-lasting progression-free survival, one group with an intermediate response, and one group of patients who did not benefit from the treatment. Importantly, long-term progression-free survival was associated with high expression of mRNA coding for the NER protein ERCC1 and low expression levels of the recombination proteins BRCA1 and BRCA2. In marked contrast, high expression of BRCA1/BRCA2 and low expression of ERCC1 were associated with lack of clinical response to ET-743 in every one of the 14 patients in this group.

Taken together, we have identified the formation of replication-dependent DSBs as a crucial component of the cytotoxic activity of ET-743 and provided a model explaining the involvement of replication and HR repair in the processing of ET-induced DNA lesions. Our data provide a rationale to use expression levels of selected repair factors for clinical response prediction and underline the interplay between macromolecular synthesis and repair pathways in DNA lesion processing.

## Experimental Procedures

**Chemicals and Cells.** ET-743 was generously provided by the National Cancer Institute (Frederick, MD), and thymidine, aphidicolin, and nocodazole were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA).

HeLa cervical carcinoma cells and CEM lymphoblastic leukemia cells have been described previously (6). Recombination-deficient cell lines and their corresponding repair-proficient parental cells were generously provided by Malgorzata Zdzienicka (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). The cells include *irs1*, defective in XRCC2 (32); *irs1SF*, defective in XRCC3 (33, 34); CL-V4B, defective in RAD51C (35); V-C8, defective in BRCA2/XRCC11/FANCD1 (36); and XR-V 15B, defective in Ku80/XRCC5 (37, 38).

DNA-PK-deficient Fus9 human M059J glioblastoma cells and DNA-PK-proficient Fus1 cells (39) were kindly provided by Bernard Salles (Centre National de la Recherche Scientifique/University Paul Sabatier, Toulouse, France). All cell lines were tested regularly for *Mycoplasma* contamination by PCR analysis.

**Cell Synchronization.** To synchronize HeLa cells in G<sub>1</sub>, cells were treated with nocodazole (75 ng/ml) for 18 h followed by mitotic shake-off (70–90% mitotic cells) and postincubation in drug-free media for 3 h. A double thymidine block was used to synchronize cells at the G<sub>1</sub>/S border. Cells were incubated with 2 mM thymidine for 16 h followed by 8 h of recovery and a second 16-h thymidine

<sup>||</sup>Schöffski, P., Casali, P. G., Taron, M., Van Oosterom, A. T., Judson, I. R., Grosso, F., Blay, J.-Y., Maki, R. G., Tercero, J. C., Jimeno, J. M., Rosell, R. (2006) 42nd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 2–6, 2006, Atlanta, GA, abstr. 9522.

exposure followed by 3 h postincubation in drug-free media to permit the cells to enter S (>80% S-phase cells).

For “biological” synchronization, nonproliferating lymphocytes (that are in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle) were isolated from the peripheral venous blood of healthy donors by Ficoll centrifugation according to standard procedures (40).

**Cell Cycle Analysis and Inhibition of DNA Synthesis.** Cell cycle analysis was determined by flow cytometry analysis, and inhibition of DNA synthesis was determined by incorporation of radioactive thymidine as described previously (7, 41). Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

**Viability Assays.** The cytotoxic activity of ET-743 was measured by using the MTT colorimetric assay as previously described (6). All values are averages of at least three independent experiments, each done in duplicate.

For annexin V labeling, ET-treated cells were rinsed and stained with annexin V-FITC (Molecular Probes Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 15 min at room temperature in the dark followed immediately by flow cytometry on an Epics XL/MCL flow cytometer (Beckman Coulter, Roissy, France).

**Single-Cell Electrophoresis.** Cells for comet analysis were exposed to the indicated drug concentrations at 37°C in the dark and analyzed immediately according to previously published procedures (21, 23, 42). Image analysis was performed by using Komet 5.5 software (Kinetic Imaging, Nottingham, U.K.). At least 100 cells were analyzed per sample. Values represent the average of at least two independent experiments.

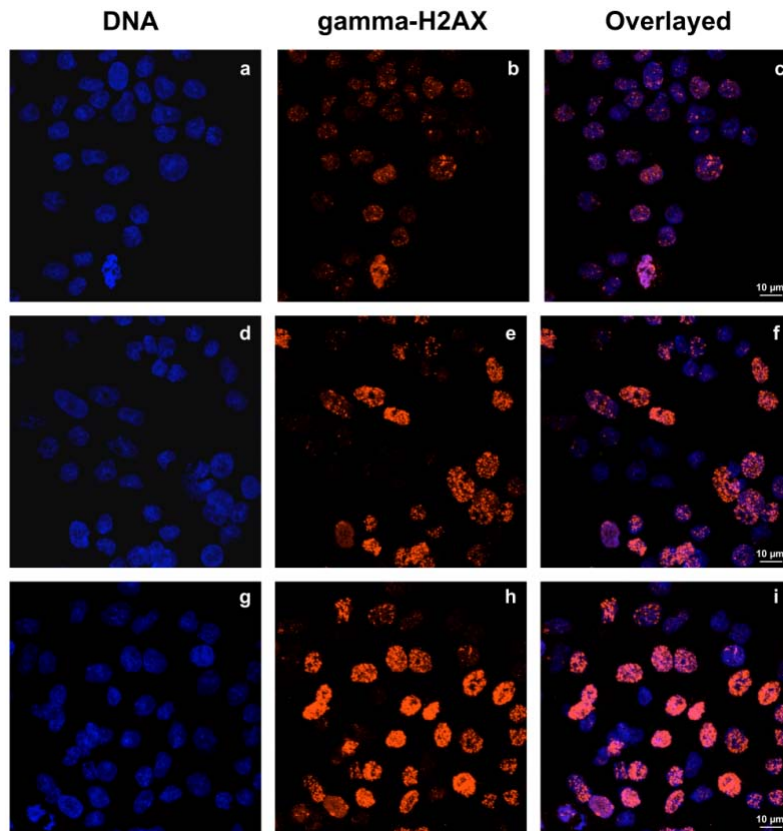
**Immunofluorescence and Microscopy.** HeLa, AA8, or Irs1SF cells were plated onto coverslips and grown overnight before treatment with ET-743. CEM cells were treated with ET-743 and fixed onto

coverslips by cytospin (4 min at 265 × g, Cytospin; StatSpin, Norwood, MA). After treatment, cells were fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with PBS/Triton X-100 (0.5%) for 20 min. Coverslips were saturated in presence of PBS<sup>+</sup> (PBS containing 1% BSA and 0.2% gelatin; Sigma), and antigens were revealed by immunolabeling using primary mouse antibodies directed against γ-H2AX (1:100 dilution; catalog no. 05-636; Upstate Biotechnology). The secondary antibody used in this study was Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (1:100 dilution; catalog no. 715-165-151; Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME). All antibodies were diluted in PBS<sup>+</sup>. Topro-3 was added to label DNA (1:5,000 dilution, T3605; Molecular Probes Invitrogen), and images were collected by using either a TCS SP confocal microscope (Leica) or a Retiga 1300 camera (QImaging, Burnaby, Canada) attached to a Nikon TS 100 microscope. Fluorescence intensities were measured by using MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA). Background over noncellular regions was subtracted.

**Karyotype Analysis.** V79 parental cells and V-C8 mutant cells (BRCA2/XRCC1/FANCD1<sup>-</sup>) were exposed for 1 h to the indicated doses of ET-743. Cells were washed with PBS and postincubated in drug-free medium for 24 h, and chromosome spreads were prepared as described (22). One hundred metaphases per treatment condition were evaluated.

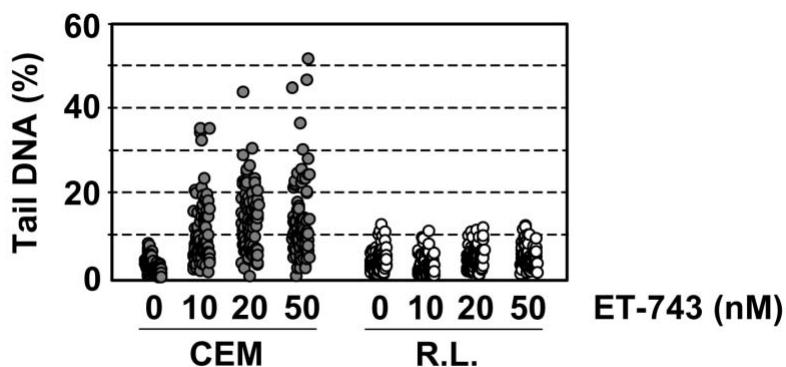
We warmly thank Drs. Malgorzata Zdzienicka and Bernard Salles for generously providing us with the recombination-deficient cells and Dr. Christine Perot for help with the karyotype analysis. We also thank Dr. Jose Jimeno for helpful discussions. This work was supported by Fondation Pour la Recherche Médicale, Association Pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif, France) Grant 3795, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Comité Français Pour l'évaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil Grant 583/07. D.G.S. was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil.

- Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama SI, Popescu N, et al. (2001) *Nat Med* 7:961–966.
- Damia G, Silvestri S, Carrassa L, Filiberti L, Faircloth GT, Liberi, Foiani M, D'Incalci M (2001) *Int J Cancer* 92:583–588.
- Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M (2001) *Eur J Cancer* 37:97–105.
- Zewail-Foote M, Li VS, Kohn H, Bearss D, Guzman M, Hurley LH (2001) *Chem Biol* 8:1033–1049.
- Jaspers NG, Raams A, Kelner MJ, Ng JM, Yamashita YM, Takeda S, Morris TC, Hoeijmakers JH (2002) *DNA Repair* 1:1027–1038.
- Poindessous V, Koepfel F, Raymond E, Comisso M, Waters SJ, Larsen AK (2003) *Clin Cancer Res* 9:2817–2825.
- Koepfel F, Poindessous V, Lazar V, Raymond E, Sarasin A, Larsen AK (2004) *Clin Cancer Res* 10:5604–5613.
- Wu J, Ling X, Pan D, Apontes P, Song L, Liang P, Altieri DC, Beerman T, Li F (2005) *J Biol Chem* 280:9745–9751.
- Dziegielewska B, Beerman TA, Bianco PR (2006) *J Mol Biol* 361:898–919.
- Léonce S, Perez V, Lambel S, Peyroulan D, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, Atassi G, Hickman JA, Pierré A (2001) *Mol Pharmacol* 60:1383–1391.
- Léonce S, Kraus-Berthier L, Golsteyn RM, David-Cordonnier MH, Tardy C, Lansiaux A, Poindessous V, Larsen AK, Pierré A (2006) *Cancer Res* 66:7203–7210.
- Sakai R, Rinehart KL, Guan Y, Wang AH (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11456–11460.
- Martinez EJ, Corey EJ, Owa T (2001) *Chem Biol* 8:1151–1160.
- Yovine A, Riefrio M, Blay J-Y, Brain E, Alexandre J, Kahatt C, Taamma A, Jimeno J, Martin C, Salhi Y, et al. (2004) *J Clin Oncol* 22:890–899.
- Le Cesne A, Blay J-Y, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, Lorigan P, Rodenhuis S, Ray-Coquard I, Bonvalot S, et al. (2005) *J Clin Oncol* 23:576–584.
- Sessa C, De Braud F, Perotti A, Bauer J, Curigliano G, Noverasco C, Zanaboni F, Gianni L, Marsoni S, Jimeno J, et al. (2005) *J Clin Oncol* 23:1867–1874.
- Fayette J, Coquard IR, Alberti L, Ranchère D, Boyle H, Blay J-Y (2005) *Oncologist* 10:827–832.
- Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn KW (1996) *Biochemistry* 35:13303–13309.
- Zewail-Foote M, Hurley LH (1999) *J Med Chem* 42:2493–2497.
- Soares DG, Poletto NP, Bonatto D, Salvador M, Schwartzmann G, Henriques JA (2005) *Biochem Pharmacol* 70:59–69.
- Herrero AB, Martin-Castellanos C, Marco E, Gago F, Moreno S (2006) *Cancer Res* 66:8155–8162.
- Wojewodzka M, Buraczewska I, Kruszewski M (2002) *Mutat Res* 518:9–20.
- Olive PL, Banáth JP (2006) *Nat Protocols* 1:23–29.
- Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers NG, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2004) *Mol Cell Biol* 24:5776–5787.
- Dunkern TR, Kaina B (2002) *Mol Biol Cell* 13:348–361.
- Xie A, Puget N, Shim I, Odate S, Jarzyna I, Bassing CH, Alt FW, Scully R (2004) *Mol Cell* 16:1017–1025.
- Thiriet C, Hayes JJ (2005) *Mol Cell* 18:617–622.
- Eppink B, Wyman C, Kanaar R (2006) *Exp Cell Res* 312:2660–2665.
- Sastry M, Fiala R, Lipman R, Tomasz M, Patel DJ (1995) *J Mol Biol* 247:338–359.
- David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Rosu F, Colson P, de Pauw E, Michel S, Tillequin F, Koch M, Hickman JA, et al. (2005) *Mol Cancer Ther* 4:71–80.
- Marco E, Gago F (2005) *Mol Pharmacol* 68:1559–1567.
- Keohane A, Godden J, Stratford IJ, Adams GE (1990) *Br J Cancer* 61:722–726.
- Fuller LF, Painter RB (1988) *Mutat Res* 193:109–121.
- Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, Liu N, Legerski RJ, Thompson LH (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6354–6358.
- Godthelp BC, Wiegant WW, van Duijn-Goedhart A, Schärer OD, van Buul PP, Kanaar R, Zdzienicka MZ (2002) *Nucleic Acids Res* 30:2172–2182.
- Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, van Lange RE, Essers J, van Duijn-Goedhart A, Wiggers I, Swaminathan S, van Buul PP, Errami A, Tan RT, et al. (2002) *Mol Cell Biol* 22:669–679.
- Zdzienicka MZ, Tran Q, van der Schans GP, Simons JW (1988) *Mutat Res* 194:239–249.
- Errami A, Smider V, Rathmell WK, He DM, Hendrickson EA, Zdzienicka MZ, Chu G (1996) *Mol Cell Biol* 16:1519–1526.
- Hoppe BS, Jensen RB, Kirchgessner CU (2000) *Radiat Res* 153:125–130.
- Boyum A (1977) *Lymphology* 10:71–76.
- Skladanowski A, Côme M-G, Sabisz M, Escargueil AE, Larsen AK (2005) *Mol Pharmacol* 68:625–634.
- De Meo M, Laget M, Castegnaro M, Dumenil G (1991) *Mutat Res* 260:295–306.



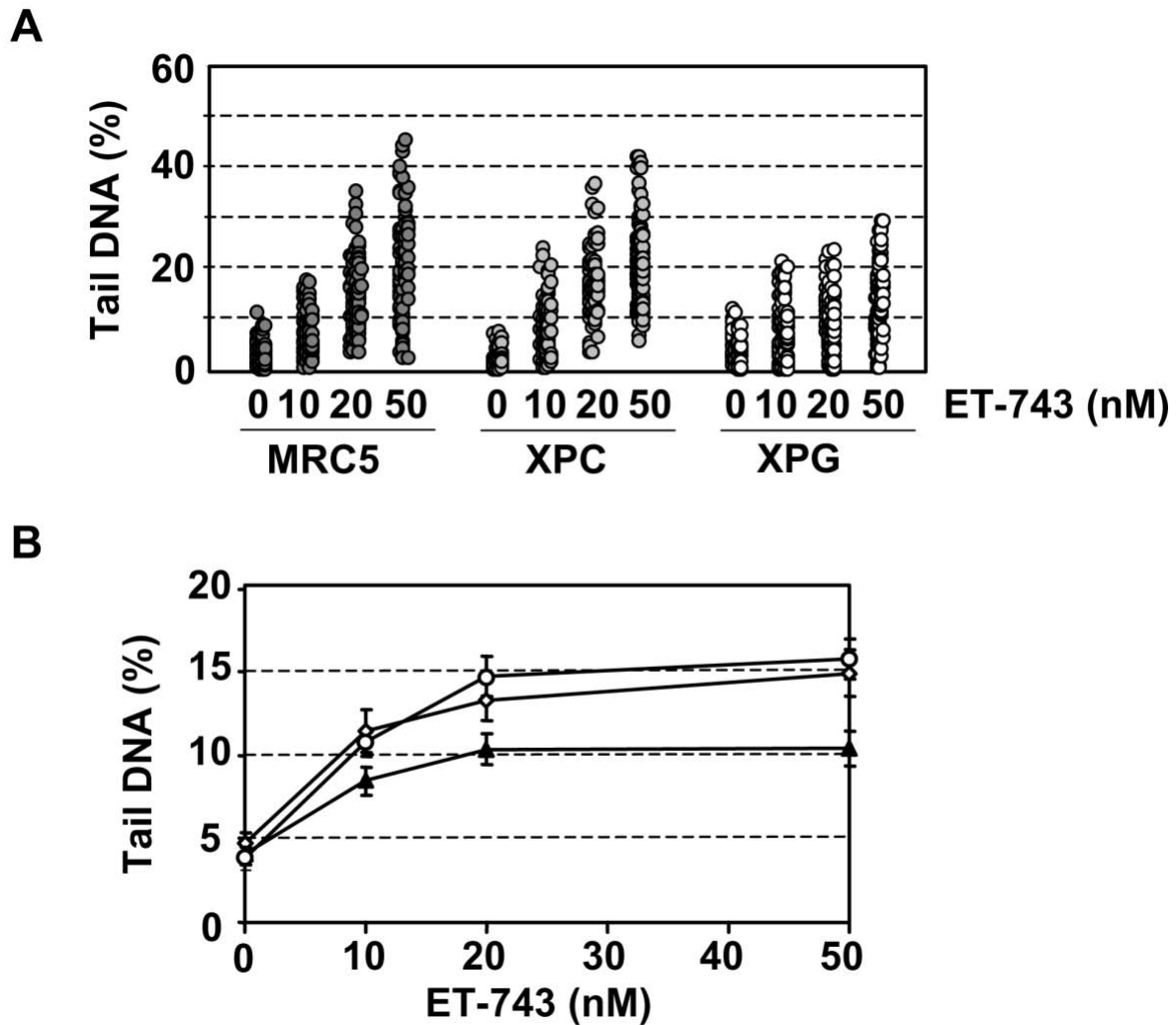
SI Figure 5

**Fig. 5.** Confocal fluorescence microscopy of AA8 cells incubated with increasing concentrations of ET-743. Cells were incubated with either 0 (*a-c*), 10 (*d-f*), or 20 nM (*g-i*) ET-743 for 1 h, fixed, and labeled with a  $\gamma$ -H2AX-directed antibody. DNA was counterstained with Topro-3.



SI Figure 6

**Fig. 6.** Formation of DSBs in leukemia cells and in quiescent lymphocytes. CEM human lymphocytic leukemia cells and resting lymphocytes (R.L.), isolated from the peripheral blood of healthy donors, were exposed to the indicated concentrations of ET-743 for 1 h followed by the alkaline comet assay. Each point represents the amount of DNA in the comet tail of an individual cell from a typical experiment.



SI Figure 7

**Fig. 7.** Formation of DSBs in NER-proficient and -deficient cells. WT MRC5 cells, GGR-deficient XPC cells, and TCR-deficient XPG-CS cells were exposed to the indicated concentrations of ET-743 for 1 h followed by the neutral comet assay. (A) Each point represents the amounts of DNA in the comet tail of an individual cell from a typical experiment. (B) Average levels of DNA damage from at least three independent experiments. Open circles, MRC5 cells; open diamonds, XPC cells; black triangles, XPG-CS. Error bars represent standard errors.

# V. DISCUSSÃO



### ***A interferência do BER na citotoxicidade da ET-743***

Os experimentos realizados neste trabalho revelaram que o mecanismo de citotoxicidade da ET-743 na levedura *Saccharomyces cerevisiae* envolve a participação de proteínas de vias de reparação de DNA. Assim como os resultados descritos anteriormente para células de mamíferos (Takebayashi et al., 2001b; Zewail-Foote et al., 2001), a ausência das endonucleases do NER (Rad1/Rad10, Rad2) em levedura, torna as células resistentes à ET-743. Do mesmo modo, considerando valores de sobrevivência em torno de 20% (dose 4 $\mu$ M; **Fig.2A** Capítulo 1), a ausência do GG-NER (Rad4) não modifica a sensibilidade das células tratadas com o agente alquilante ET-743.

Sendo a levedura um bom modelo biológico para estudar o mecanismo de ação de diferentes agentes que interferem com o DNA e considerando que existe interação entre os sistemas de reparação na tentativa de remoção dos danos gerados por agentes antitumorais (Beljanski et al., 2004), nós avaliamos a participação de outros sistemas de reparação na toxicidade da ET-743.

Inicialmente, considerando a presença de outras endonucleases na célula, a proteína Apn1 (APE1) do BER foi avaliada. A resistência de linhagens celulares de levedura deficientes na proteína Apn1 (**Fig.2B**, Capítulo 1), apresentada neste estudo, contribui para explicar o mecanismo de ação do agente alquilante.

APE1 é o homólogo da proteína Xth (exonuclease III) de *E. coli*, foi primeiramente purificada de células humanas na década de 80 (Kane e Linn, 1981) e teve o seu DNA identificado dez anos mais tarde (Dempfle et al., 1991). APE1 é uma proteína nuclear de 35,5 KDa que possui papel central em ambas as vias (curta e longa) do BER. É a principal endonuclease tanto em células de mamíferos quanto em levedura, responsável por aproximadamente 95% da atividade de endonuclease

nas células (Boiteux e Guillet, 2004). Possui forte atividade de endonuclease dependente de  $Mg^{2+}$  e é responsável por hidrolizar a região 5' de sítios abásicos no DNA, gerando uma extremidade 3' OH e 5' dRP (Boiteux e Guillet, 2004). Além de atuar na reparação, APE1 é conhecida por agir como um fator efetor de oxidação-redução, recebendo por isso, o nome alternativo de Ref-1 (Evans et al., 2000),

Níveis elevados de APE1/Ref-1 têm sido encontrados em diversos tipos de cânceres, como gliomas (Bobola et al., 2001), câncer de próstata (Kelley et al., 2001) e sarcomas (Wang et al., 2004). Acredita-se que o aumento da expressão da enzima 'chave' do BER esteja relacionado com a maior eficiência do reparo de danos induzidos pela quimioterapia tornando as células resistentes aos agentes terapêuticos (Robertson et al., 2001).

Interessantemente, a ET-743 tem mostrado potente atividade contra sarcomas (*soft tissue sarcomas*; STS), tumores que apresentam níveis elevados de APE1. Além dos sarcomas, a ET-743 tem mostrado atividade contra uma variedade tumores e encontra-se na fase II e III dos ensaios clínicos para o tratamento de câncer de mama, ovário e próstata (O'Hanlon, 2006).

O emprego da ET-743 em sarcomas vem sendo extensivamente estudado, principalmente devido a sua potente atividade como droga de segunda escolha após o desenvolvimento de resistência a outras drogas (Schöffski et al., 2007). STS são um grupo de tumores heterogêneos, raros, que constituem aproximadamente 1% dos tumores sólidos malignos em adultos. Compreendem mais do que 50 tipos histológicos que apresentam comportamento biológico distinto. Ao contrário da vasta maioria dos carcinomas comuns, de origem epitelial, os sarcomas são derivados do tecido mesenquimal e podem envolver tecidos conectivos, vísceras e qualquer outra

parte do corpo humano, porém, aproximadamente dois terços dos sarcomas ocorrem nas extremidades (Kotilingam et al., 2006).

O interesse na busca de drogas que possam ser utilizadas no tratamento deste tipo de tumor está baseado na gravidade da doença. Após a detecção do tumor, 50% dos pacientes apresentam tempo médio de sobrevida de apenas 5 anos. Alguns sarcomas de origem óssea, como o sarcoma de Ewing's, são geralmente fatais e mostram baixa resposta aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (Cormier e Pollock, 2004; Kotilingam et al., 2006). Além deste fator, é importante ressaltar que os STS não respondem à maioria das drogas disponíveis, sendo a doxorrubicina e a ifosfamida as mais ativas (Fayette e Blay, 2005).

Em um interessante estudo realizado por Wang et al. (2004), níveis elevados da proteína APE1 foram identificados em 72% dos casos de osteosarcoma estudados, mostrando elevada correlação entre os altos níveis de expressão de APE1 e o reduzido tempo de sobrevivência dos pacientes. Além disso, os autores mostram que a redução da expressão de APE1 através do silenciamento da proteína por RNA de interferência (siRNA), sensibiliza as células a agentes alquilantes como metilmetano sulfonato (MMS), agentes oxidativos como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), quimioterapêuticos como o etoposídeo e frente a radiação ionizante (Wang et al., 2004).

Os resultados obtidos nesta tese confirmam a caracterização da ET-743 como sendo uma droga que possui mecanismo de ação peculiar, isto é, diferente dos agentes antitumorais utilizados comumente na clínica. Neste estudo, células de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes na proteína Apn1 mostraram-se resistentes à ação da ET-743. Em contrapartida, a sensibilidade do mutante simples Apn1 já foi

descrita para agentes alquilantes como MMS, *t*-butilhidroperóxido (t-BOOH) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ramotar et al., 1991).

Embora o papel da proteína Apn1 na citotoxicidade da ET-743 ainda deva ser melhor explorado, os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir uma possível explicação para a sensibilidade dos sarcomas ao tratamento com ET-743. Considerando que a resistência dos tumores STS à maioria das drogas clássicas seja devido a superexpressão de APE1, entre outros fatores (para revisão ver Fayette e Blay, 2005), e que a ausência de Apn1 torna as células eucarióticas resistentes à ET-743, estes dados contribuem para explicar por que STS, tumores que superexpressam esta proteína, são sensíveis ao tratamento com ET-743.

Ainda, o emprego de linhagens de levedura contendo combinações de mutações mostrou que a resistência das células à ET-743 depende da funcionalidade de pelo menos uma das vias de reparação por excisão. Como pode ser observado na **Figura 4** (Capítulo 1), uma interação epistática entre as endonucleases do BER e NER ocorre, evidenciando que as duas vias de reparação estão envolvidas na promoção de citotoxicidade pela ET-743. A presença de pelo menos uma endonuclease funcional de cada via (Apn1, Rad1 ou Rad2) é necessária para a atividade citotóxica da ET-743.

Considerando estas observações, seria esperado que um mutante viável deficiente nas principais endonucleases do BER e NER (*apn1rad1rad2*) fosse resistente em resposta aos danos gerados pela ET-743. Embora esse mutante ainda não tenha sido descrito na literatura, a sensibilidade apresentada pelas linhagens deficientes nas glicosilases do BER (mutantes *ntg1*, *ntg2*, *ntg1ntg2*, **Fig.3A** Capítulo 1) corrobora o modelo proposto.

Todavia possa ser concluído que as DNA-glicosilases/AP-liases Ntg1 e Ntg2 não estão envolvidas com o processamento dos adutos gerados pela ET-743, o papel das glicosilases Ogg1 e Mag1 ainda deve ser esclarecido em vista da resistência apresentada por estes mutantes (**Fig. 2B**, Capítulo 1).

A proposta para o mecanismo de ação para a ET-743 em células de levedura foi desenvolvida a partir de observações prévias que mostraram que a ET-743 é capaz de formar adutos covalentes na volta menor DNA (Pommier et al., 1996; Moore et al., 1997) e que a subunidade C permanece projetada para o exterior da hélice (Zewail-Foote e Hurley, 1999). Assim, considerando a hipótese de formação de um complexo tóxico ET-DNA-proteínas que foi proposta primeiramente por Zewail-Foote e colaboradores em 2001 (Zewail-Foote et al., 2001), um modelo para a citotoxicidade da ET-743 foi criado pelo nosso grupo. Neste modelo, as endonucleases do NER ou do BER formam um complexo com a ET-743 e, conseqüentemente, com o DNA, o que impede a continuidade da cascata de reparação. Esse complexo é capaz de induzir morte celular e, portanto, promover a citotoxicidade de células tumorais que possuem expressão aumentada das endonucleases envolvidas neste complexo (**Fig.5**, coluna da esquerda, Capítulo 1).

### ***A tolerância dos danos gerados pela ET-743 e a indução de mutações***

A avaliação da sensibilidade dos mutantes deficientes em duas vias de reparação de DNA somado aos experimentos de mutagênese foram realizados com o objetivo de esclarecer a interrelação entre os sistemas de reparação e o mecanismo de ação da ET-743 em levedura.

Os diferentes níveis de sensibilidade dos quádruplos mutantes deficientes no BER em combinação com o NER (*ntg1ntg2apn1rad1*), com a recombinação homóloga (*ntg1ntg2apn1rad52*) e com a síntese translesão (*ntg1ntg2apn1rev3*) (**Fig.3B**, Capítulo 1) mostram que a resistência decorrente da ausência de uma das endonucleases 'chave' das vias BER e/ou NER ocorre como resultado da promoção de efeitos mutagênicos e recombinogênicos. A sensibilidade intermediária dos mutantes BER/HR (*ntg1ntg2apn1rad52*) e BER/TLS (*ntg1ntg2apn1rev3*) confirma a atuação das duas vias na tolerância dos danos gerados pela ET-743. No primeiro caso (mutante BER/HR), a sobrevivência é decorrente da indução de mutações controladas pela ação da polimerase translesão  $\zeta$  (Pol zeta; Rev3) (via indutora erro; *error-prone*), enquanto que no segundo caso (mutante BER/TLS), a sobrevivência é resultado da indução de uma via livre de erro (*error-free*), a recombinação homóloga.

Muitas das lesões que bloqueiam a replicação são usualmente reparadas pelo NER ou BER. Se estas vias estão saturadas ou inativas (como no caso dos mutantes utilizados neste estudo), a morte celular pode ser induzida. Para prevenir a morte celular nestas circunstâncias, as células dispõem de mecanismos de segurança, as chamadas vias de tolerância de danos (revisado em Broomfield et al., 2001). Neste sistema, a DNA- polimerase replicativa, bloqueada pela presença do dano, é substituída por uma (ou várias) polimerases de baixa fidelidade, como por exemplo Pol $\zeta$ [zeta](Rev3), Pol $\eta$ [eta](Rad30), Pol $\kappa$ [kappa], Pol $\iota$ [iota] ou Rev1 (Kannouche e Stry, 2003; Prakash et al., 2005). Embora seja conhecido que Pol $\eta$ [eta](Rad30) esteja envolvida na síntese translesão livre de erro (Carty et al., 2003), o mutante quádruplo deficiente na proteína Rev3 (Pol $\zeta$ ) submetido ao UV (**Tab.2** coluna da esquerda, Capítulo 1) apresentou aumento na taxa de mutação

quando comparado à linhagem selvagem. Contudo, quando se observa a ausência de mutações induzidas pela ET-743 neste mutante (**Tab.2** coluna da direita, Capítulo 1), conclui-se que mutagênese induzida pelo complexo tóxico ET-DNA-endonucleases é dependente principalmente de Rev3.

Em vista dos dados obtidos através dos ensaios de mutagênese, recombinação e toxicidade geradas pela ET-743, o modelo proposto (**Fig.5** coluna central, Capítulo 1) mostra que na ausência das endonucleases do BER/NER o complexo tóxico ET-DNA-proteínas não é capaz de se formar e uma DNA-polimerase (provavelmente Rev3) consegue sintetizar o DNA através do dano. Apesar disso, de acordo com a resistência apresentada pelo mutante simples *rev3*, conclui-se que a ativação do TLS pode ocorrer também nos mutantes que possuem as endonucleases funcionais, neste caso, por ação de outra DNA-polimerase translesão (Rad30) (**Fig.5** coluna da direita, Capítulo 1).

Outros agentes antitumorais também se comportam da mesma maneira que a ET-743. A mutagênese induzida pela cisplatina é menor em linhagens celulares que apresentam deficiência na expressão de Rev3, sugerindo que a Pol $\zeta$  está envolvida na síntese de DNA indutora de erro através dos adutos de platina no DNA (Wu et al., 2004).

Apesar disto, a ET-743 não pode ser comparada à cisplatina, já que estudos têm mostrado que níveis reduzidos de diversas proteínas envolvidas no TLS, incluindo Rad18, Rev1 e a subunidade catalítica da Pol $\zeta$ , reduzem enormemente a resposta mutagênica sem alterar significativamente a citotoxicidade da cisplatina (Wu et al., 2004; Watson et al., 2006) o que não ocorre no caso da ET-743.

### ***A geração de DSBS e o papel da recombinação homóloga na reparação dos danos causados pela ET-743***

De acordo com os resultados obtidos nesta tese, o sistema de reparação por recombinação homóloga é tão (ou mais) importante que o NER na modulação da resposta à ET-743 em células de mamífero. A sensibilidade à ET-743 das células de mamíferos deficientes em HR (XRCC3, XRCC2, BRCA2 e RAD51C) é de 8 a 23 vezes maior (**Fig. 3**, Capítulo 2) do que a linhagem parental, enquanto que a perda do NER está associada com aumento de 2 a 8 vezes na resistência (Damia et al., 2001; Erba et al., 2001; Takebayashi et al., 2001b; Soares et al., dados não publicados).

Conforme observado em células de *S. cerevisiae* (Capítulo 1) e também em células de mamífero (Soares et al., dados não publicados), sabe-se que os adutos ET-DNA são reconhecidos pelo BER e pelo TC-NER. O TC-NER é um processo que inicia-se a partir do bloqueio da RNA polimerase II no momento que esta encontra a lesão mas, apesar disto, o tratamento prévio das células com DRB, um inibidor seletivo da RNA polimerase II, não exerce influência sobre a geração de quebras duplas induzidas pela ET-743 (Soares et al., dados não mostrados), sugerindo que a síntese de RNA não contribui para a formação de DSBs. Interessantemente, resultados similares foram previamente descritos para a mitomicina C (Sastry et al., 1995), outro agente que se liga na volta menor do DNA e está associado com a formação de quebras duplas dependentes de replicação (Niedernhofer et al., 2004).

Embora a mitomicina C seja um indutor de ICLs, evidências bioquímicas e modelos moleculares indicam que a ET-743 apresenta algumas propriedades similares a este tipo de agente. Em vista disto, a conversão dos adutos de ET em DSBs deve, pelo menos em parte, ser explicada pela influência da lesão sobre a



dinâmica da hélice do DNA. Experimentos usando oligonucleotídeos mostram que os níveis de retardação dos fragmentos de DNA em gel ocorrem devido a uma desestabilização da hélice e ao aparecimento de uma banda correspondente a ssDNA alquilados. Resultados positivos neste ensaio são descritos para agentes alquilantes que reagem com a posição N2 de guaninas na volta menor do DNA, como os derivados de benzoacronicina S23906-1 e S29385-1, mas não para a ET-743 (David-Cordonnier et al., 2005b). Além disso, a ET-743, assim como a doxorubicina, promove aumento na temperatura necessária para promover a desnaturação térmica do DNA (David-Cordonnier et al., 2005b) e impede a separação das fitas de DNA pela helicase RecBCD (Dziegielewska et al., 2006). O conjunto destes estudos sugere que a ET-743 estabiliza a estrutura do dúplice e, assim como o agente indutor de *crosslinks* mitomicina C, induz quebras duplas de DNA que são dependentes de replicação.

A indução de quebras duplas induzidas pela ET-743 ocorre de maneira dose-dependente (**Fig.1C**, Capítulo 2), assim como a inibição da síntese de DNA (**Fig.1A**, Capítulo 2) e a citotoxicidade (**Fig.1B**, Capítulo 2), que também podem ser observadas na mesma faixa de dosagem.

A indução de DSBs no DNA foi mostrada através do ensaio cometa e confirmada através da detecção da formação de gamma-H2AX medida por microscopia confocal de fluorescência (**Fig. 1D e 1E**, Capítulo 2).

O ensaio cometa, também chamado de eletroforese em gel de célula única (*single cell gel electrophoresis*, SCGE) é um teste rápido, visual e quantitativo para medir danos ao DNA de células eucarióticas individuais (Burlinson et al., 2007). A versão neutra do ensaio cometa mede a formação de quebras duplas como

resultado da utilização de condições que não promovem desnaturação do DNA (Olive e Banath, 2006).

Assim como o ensaio cometa, a determinação de gamma-H2A(X) tem sido extensivamente utilizada como marcador de quebras duplas no DNA (Rodrigue et al., 2006; Wykes et al., 2006 ; Bekker-Jensen et al., 2006). De acordo com Modesti e Kanaar (2001), a fosforilação da histona H2AX ocorre após poucos minutos da exposição de células à radiação ionizante, e a formação de focos detectados por imunocitoquímica é um indicativo sensível da existência de uma DSB no DNA. Os focos de gamma-H2AX podem ser observados como consequência da reestruturação da cromatina que ocorre com a finalidade de reter e conservar os fatores de sinalização/reparo no local da lesão, auxiliando na manutenção das extremidades finais de DNA próximas uma da outra (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Neste estudo, a análise da formação de H2AX fosforilada impulsionou as conclusões sobre a geração de quebras duplas no DNA dependentes de replicação. A ausência completa de gamma-H2AX em algumas células sugere a influência do ciclo celular nas DSBs induzidas pela ET-743 (**Fig.1E**, Capítulo 2).

Dando continuidade a estes estudos, a aphidicolina, um inibidor reversível da síntese de DNA, foi empregada com o objetivo de confirmar a influência do ciclo celular nas quebras induzidas pela ET-743. Após um pré-tratamento das células com aphidicolina observa-se diminuição na formação de quebras duplas induzidas pela ET-743 (**Fig.2A**, Capítulo 2). As DSBs são reestabelecidas após a retirada do inibidor do meio de cultura (**Fig.2B**, Capítulo 2), revelando que a reiniciação da síntese de DNA é crítica para a geração de quebras induzidas pela ET-743.

Estes experimentos, adicionados dos resultados obtidos no ensaio cometa após sincronização das células nas fases G1 e S confirmam que a ET-743 é um

agente alquilante que induz DSBs no DNA que são dependentes de replicação. Células sincronizadas em fase G1 apresentam menor índice de DSBs quando comparadas às células sincronizadas em fase S e não sincronizadas (**Fig.2C**, Capítulo 2).

A indução de lesões secundárias (DSBs) não é restrita para a ET-743 e já tem sido demonstrada para outros agentes que interagem com o DNA, como para o indutor de *crosslinks* mitomicina C (Niedernhofer et al., 2004) e o alquilante monofuncional S23906 (Léonce et al., 2006). Acredita-se que as lesões secundárias são geradas no momento em que a forquilha de replicação encontra os adutos (lesão primária) no DNA.

Assim como observado inicialmente em células de *Saccharomyces cerevisiae*, o sistema HR é responsável pela reparação dos danos induzidos pela ET-743 nas células de mamíferos. A extrema sensibilidade das linhagens deficientes nas proteínas da via HR, assim como as aberrações cromossômicas induzidas nestas células, confirmam esta hipótese. As DSBs não reparadas na linhagem BRCA2 (**Fig.4B**, Capítulo 2) induzem aumento no número de células contendo aberrações cromossômicas de maneira dose-dependente, sendo que na dose de 10 nM todas as metáfases observadas mostram pelo menos três aberrações. Em contrapartida, somente 1% das células parentais apresenta anormalidades cromossômicas nesta dose (**Tab.1**, Capítulo 2).

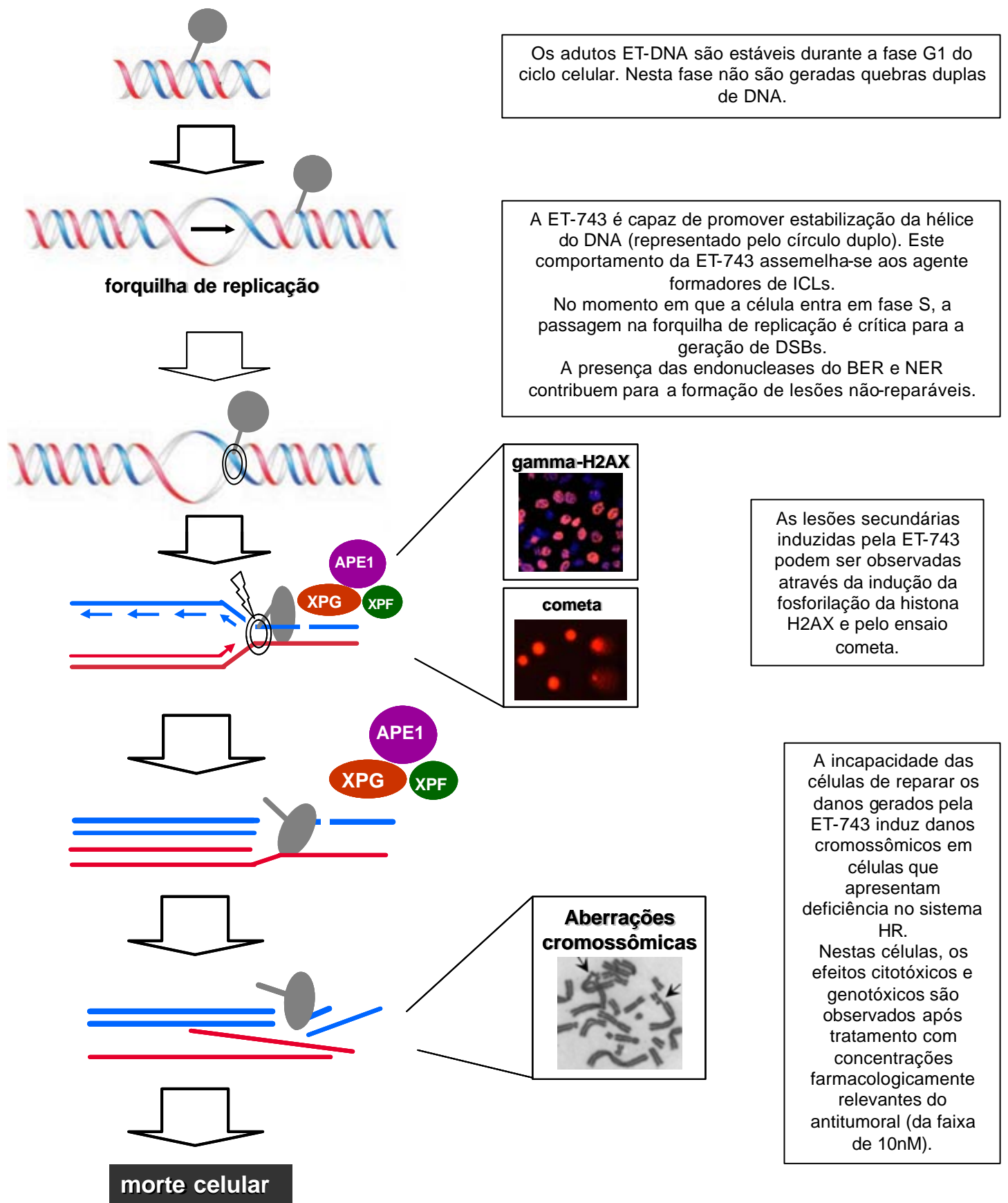
A influência da HR na modulação da citotoxicidade da ET-743 indica que a funcionalidade das vias de reparação de DNA é uma ferramenta útil na seleção de pacientes que mais podem se beneficiar do tratamento. Em vista disto, este trabalho tem como suporte um estudo clínico preliminar com 92 pacientes portadores de sarcomas (Schoffski et al., 2006). Neste estudo o grupo que mostrou maior tempo de

sobrevivência livre de progressão apresentava baixos níveis de expressão das proteínas de recombinação BRCA1/BRCA2 e níveis elevados de mRNA para a proteína ERCC1 do NER. Em contrapartida, alta expressão de BRCA1/BRCA2 e baixa de ERCC1 foi associado com a perda da resposta clínica à ET-743 (Schoffski et al., 2006).

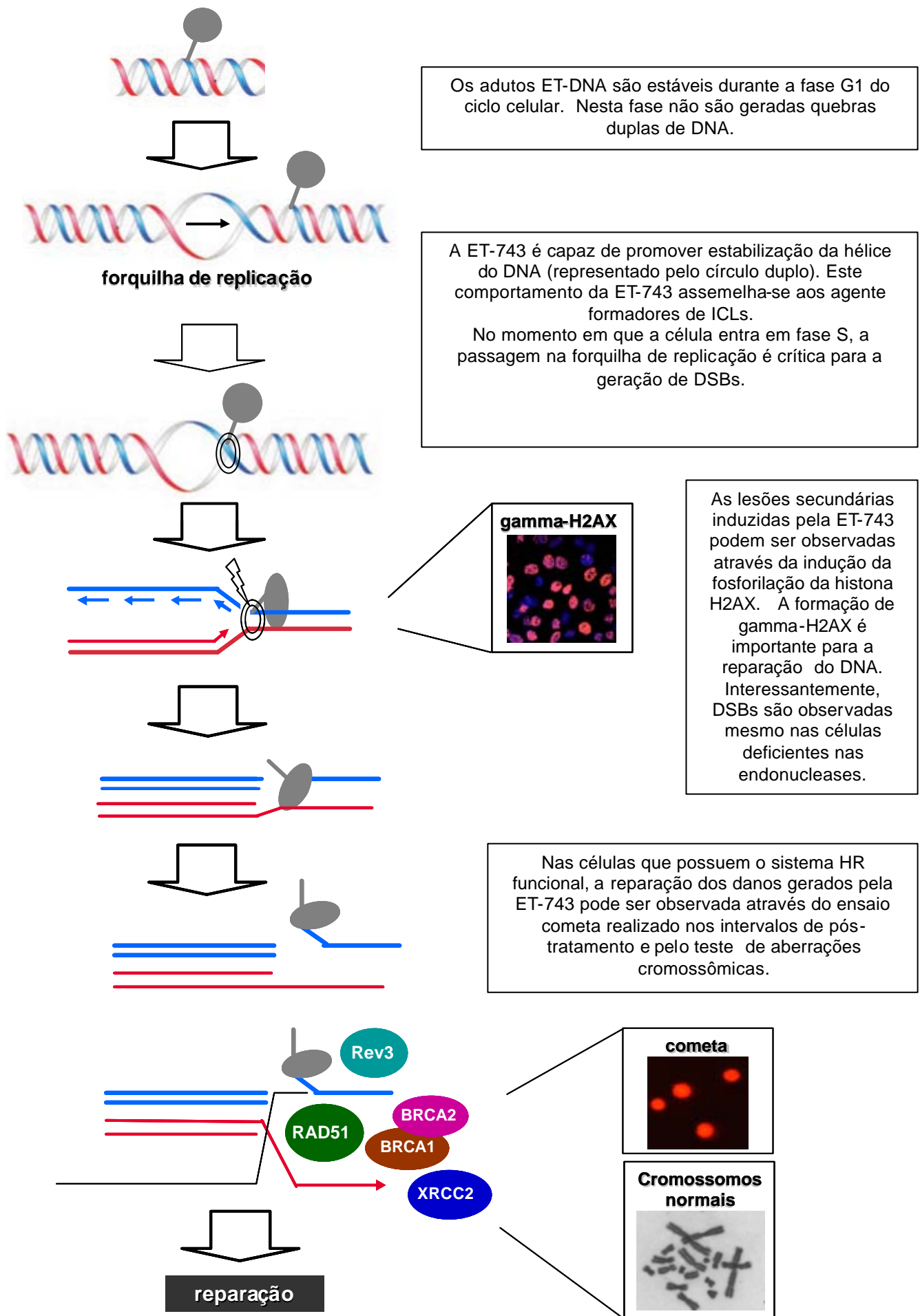
### ***Modelo para o mecanismo de ação da ET-743 em células eucarióticas sensíveis e resistentes ao tratamento***

A presença das proteínas do sistema de reparação por recombinação homóloga é crítica para a determinação da sensibilidade ou resistência das células ao tratamento com ET-743. Apesar das endonucleases do NER e BER exercerem influência no mecanismo de ação da ET-743, a recombinação homóloga parece ser mais importante na modulação da resposta celular. A extrema sensibilidade das células deficientes em HR combinado à resistência moderada apresentada pelas linhagens deficientes em NER corroboram esta hipótese. Além disso, as quebras duplas possíveis de reparação detectadas nas células deficientes em XPG, confirmam o papel da recombinação homóloga na reparação dos danos gerados pela ET-743.

As **Figuras 11 e 12** apresentam o modelo proposto para a geração de quebras duplas de DNA induzidas pela ET-743 e a reparação destas lesões através do sistema de recombinação homóloga.



**Figura 11. Modelo para a indução de quebras duplas dependentes de replicação em células sensíveis à ET-743.** Defeitos em proteínas da via de reparação por recombinação homóloga e/ou presença das endonucleases do BER e do NER tornam as células sensíveis ao tratamento com ET-743.



**Figura 12. Modelo para reparação dos danos gerados pela ET-743.** Células proficientes nas proteínas da via de reparação por recombinação homóloga e/ou deficientes nas endonucleases do BER e do NER são capazes de reparar os danos gerados pela ET-743, tornando-se menos sensíveis ao tratamento.

# VI. CONCLUSÕES

## **6.1 CONCLUSÃO GERAL**

Evidências biológicas e bioquímicas mostram que a ecteinascidina 743 apresenta um mecanismo de ação particular, envolvendo enzimas da maquinaria de reparação de DNA. Este mecanismo é distinto de outros descritos anteriormente para outras drogas. Os ensaios em modelos biológicos eucarióticos revelaram que os sistemas de reparação por excisão de DNA estão envolvidos na promoção da citotoxicidade induzida pela ET-743. Além disso, os testes de eletroforese e microscopia permitiram identificar que a ET-743, um agente alquilante monofuncional, é capaz de gerar quebras duplas de fita de DNA, que se não reparadas induzem a aberrações cromossômicas. Adicionalmente, os resultados apresentados nesta tese permitiram mostrar pela primeira vez que o processo de conversão dos adutos primários da ET no DNA em uma lesão secundária é dependente dos eventos de replicação.

Os dados apresentados nesta tese contribuem para explicar o mecanismo molecular de ação da ET-743, que até anteriormente permanecia incompreendido. Ainda, este trabalho permite a identificação de marcadores moleculares que contribuem na seleção de pacientes que podem vir melhor responder ao tratamento com este antitumoral.

## **6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS**

- As endonucleases do sistema de reparação por excisão de nucleotídeos, Rad1/Rad10 (XPG/ERCC1) e Rad2 (XPF) estão envolvidas com o mecanismo de citotoxicidade da ET-743 tanto em células de mamíferos quanto em levedura. A



ausência destas enzimas torna as células resistentes (em diferentes graus) à ET-743;

- A via de reparação por excisão de bases de levedura também influencia no mecanismo de ação da ET-743. A presença da proteína Apn1, principal endonuclease da célula, contribui na promoção da citotoxicidade após tratamento com ET-743 em células de levedura;

- A sensibilidade celular à ET-743 depende de eventos de epistasia entre os sistemas BER e NER. Através da utilização de mutantes de levedura com defeitos em uma ou duas vias de reparação de DNA foi possível observar que é necessário haver a presença de pelo menos uma endonuclease de cada uma das vias (Apn1, Rad1/Rad10 ou Rad2) para a promoção de citotoxicidade;

- O sistema TLS é responsável por tolerar os danos gerados pela ET-743, sendo a polimerase translesão Rev3 uma das responsáveis pela síntese de DNA translesão e a indução de mutações na levedura *S. cerevisiae*;

- A via de recombinação homóloga é importante na reparação dos danos gerados pela ET-743 em células de levedura. Apesar da resistência apresentada pelo simples mutantes *rad52* nas condições testadas, a utilização de mutantes deficientes em duas vias de reparação mostrou-se útil para evidenciar a interrelação entre os sistemas de reparo na tolerância e reparação destes danos;

- A exposição de células de mamíferos à ET-743 está associada com potente inibição da síntese de DNA. A inibição da síntese é observada na mesma faixa de concentração capaz de induzir morte celular (IC50 cerca de 20nM);

- O tratamento com ET-743 induz a formação de quebras duplas de DNA. Através da realização do ensaio cometa neutro, que detecta exclusivamente DSBs, e

da detecção da formação de H2AX fosforilada foi possível quantificar as DSBs geradas;

- O tratamento das células com aphidicolina, um inibidor reversível da síntese de DNA é capaz de reduzir as DSBs induzidas pela ET-743. Além disso, o tratamento de linfócitos e de células sincronizadas em fase G1 confirmam que a formação de DSBs induzidas pela ET-743 são dependentes da síntese de DNA;

- Apesar da influência das endonucleases do TC-NER (sistema que envolve o bloqueio da RNA Pol II) no mecanismo de ação da ET-743, foi possível observar que a síntese de RNA não tem influência neste mecanismo. O tratamento de células com DRB, um inibidor da síntese da RNA Pol II não aumenta a formação de DSBs em comparação com o controle;

- Linhagens celulares deficientes em proteínas envolvidas no sistema de recombinação homóloga (XRCC3, BRCA2, XRCC2, RAD51) são extremamente sensíveis à ação da ET-743, confirmando o papel desta via na reparação dos danos gerados por este agente alquilante;

- O tratamento com ET-743 durante 1 hora influencia a progressão do ciclo celular em linhagens deficientes em HR. Seis horas após tratamento com concentrações farmacologicamente relevantes de ET-743 (IC50 6nM), a maior parte das células deficientes em XRCC3 encontram-se na fase S do ciclo celular. Para a linhagem parental, este mesmo efeito só é observado quando a concentração é aumentada para 140nM de ET-743;

- A ET-743 induz aberrações cromossômicas nas células deficientes em HR. A exposição de linhagens deficientes em BRCA2 a 10nM de ET-743 está associada a danos cromossômicos. Em contrapartida, somente 1% das células parentais apresentam anormalidades cromossômicas nesta concentração;

- O ensaio cometa e a análise do cariótipo permitiram concluir que as células proficientes em recombinação homóloga são capazes de reparar (parcialmente) os danos gerados pela ET-743;

- Células deficientes em recombinação homóloga, bem como, células deficientes nas endonucleases do NER/BER são mais sensíveis ao tratamento com ET-743 quando comparadas às linhagens parentais.

# VII. PERSPECTIVAS

As conclusões sobre a interferência da ET-743 com os mecanismos de reparação de DNA obtidas nesta tese, sugerem diversos outros estudos que poderiam ser realizados para melhor explorar o seu mecanismo de ação e, desta forma, continuar a contribuir para o seu desenvolvimento clínico. Entre estes estudos destaca-se:

- estudar a cinética das modificações da histona gamma-H2AX (fosforilação e desaparecimento) após tratamento com ET-743 com o objetivo de esclarecer quais são os eventos necessários para a eficiência da reparação do DNA;
- estudar o comportamento de mutantes de levedura deficientes em diferentes histonas a fim de caracterizar o envolvimento das histonas (e suas modificações) no reparo dos danos gerados pela ET-743;
- investigar se os diferentes fatores de reparação dos sistemas NHEJ e HR são recrutados para o local do dano após geração de quebras duplas induzidas pela ET-743;
- explorar a influência da síntese de RNA na citotoxicidade promovida pela ET-743 e o papel da RNA polimerase II no reconhecimento dos adutos de ET-DNA;
- investigar os níveis de expressão da proteína APE1 após tratamento de células tumorais humanas com ET-743 e determinar se esta proteína está presente no núcleo indicando a formação do complexo ET-DNA-APE1;

- estudar a influência da utilização da combinação de diferentes agentes antitumorais na citotoxicidade da ET-743 em células de levedura com o objetivo de identificar novos possíveis protocolos a serem avaliados em células de mamíferos;
- estudar a atividade da ET-743 em tumores específicos através da utilização de modelos xenográficos animais;

# VIII. REFERÊNCIAS

1. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. **Clinical Cancer Research** 3:1763–1767, 1997.
2. Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. **DNA Repair** 5:1075 –1081, 2006.
3. Allavena P, Signorelli M, Chieppa M, Erba E, Bianchi G, Marchesi F, Olimpico CO, Bonardi C, Garbi A, Lissoni A, de Braud F, Jimeno J, D'Incalci M. Anti-inflammatory Properties of the Novel Antitumor Agent Yondelis (Trabectedin): Inhibition of Macrophage Differentiation and Cytokine Production. **Cancer Research** 65: (7). April 1, 2005.
4. Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, Cortes-Funes H, Hidalgo M. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. **Annals of Oncology** 14: 1607-1615, 2003.
5. Amor-Gu eret M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. **Cancer Letters** 236 : 1-12, 2006.
6. Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the Interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the Maintenance of G2/M arrest after DNA damage. **Journal of Biological Chemistry** 276(46): 42971–42977, 2001.
7. Aylon Y, Kupiec M. DSB repair: the yeast paradigm. **DNA Repair** 3: 797–815, 2004.
8. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. **The Journal of Cell Biology** 173, 2, 24, 195 – 206, 2006.



9. Beljanski V, Marzilli LG, Doetsch PW. DNA Damage-Processing Pathways Involved in the Eukaryotic Cellular Response to Anticancer DNA Cross-Linking Drugs. **Molecular Pharmacology** 65:1496–1506, 2004.
10. Beumer JH, Schellens JHM, Beijnen JH. Hepatotoxicity and metabolism of trabectedin: a literature review. **Pharmacological Research** 51: 391–39, 2005.
11. Beumer JH, Rademaker-Lakhai JM, Rosing H, Hillebrand MJX, Bosch TM, Lopez-Lazaro L, Schellens JHM, Beijnen JH. Metabolism of trabectedin (ET-743, Yondelis™) in patients with advanced cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 59:825–837, 2007.
12. Biroccio A, Gabellini C, Amodei S, Benassi B, Del Bufalo D, Elli R, Antonelli A, D'Incalci M, Zupi G. Telomere Dysfunction Increases Cisplatin and Ecteinascidin-743 Sensitivity of Melanoma Cells. **Molecular Pharmacology** 63(3): 632-638, 2003.
13. Bobola MS, Blank A, Berger MS, Stevens BA, Silber JR. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity Is Elevated in Human Adult Gliomas. **Clinical Cancer Research** 7 : 3510–3518, 2001.
14. Boger DL, Johnson DS. CC-1065 and the duocarmycins: unraveling the keys to a new class of naturally derived DNA alkylating agents. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** 92:3642-3649, 1995.
15. Boiteux S, Guillet M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair** 3:1–12, 2004.
16. Bonfanti M, Caretti G, LaValle E, Sousa Faro JMF, Faircloth G, Mantovani R, D'Incalci M. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. **Anticancer Drug- Design** 14, 179–186, 1999.
17. Brandon EFA, Sparidans RW, Guijt KJ, Lowenthal S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. *In vitro* characterization of the human biotransformation and CYP

- reaction phenotype of ET-743 (Yondelis, Trabectedin), a novel marine anti-cancer drug. **Investigational New Drugs** 24: 3–14, 2006.
18. Broomfield S, Hryciw T, Xiao W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research** 486 : 167–184, 2001.
19. Brugmans L, Kanaar R, Essers J. Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. **Mutation Research** 614 : 95–108, 2007.
20. Budman J, Kim SA, Chu G. Processing of DNA for Nonhomologous End-joining Is Controlled by Kinase Activity and XRCC4/Ligase IV. **The Journal of Biological Chemistry** 282(16): 11950–11959, 2007.
21. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research** 627 : 31–35, 2007.
22. Burma S, Chen BPC, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. **DNA Repair** 5:1042 –1048, 2006.
23. Carty MP, Glynn M, Maher M, Smith T, Yao J, Dixon K, McCann J, Rynn L, Flanagan A. The *RAD30* cancer susceptibility gene. **Biochemical Society Transactions** 31(1) :252-256, 2003.
24. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 53: 3–11, 2005.
25. Chawla AK, Tomasz M. Interaction of the antitumor antibiotic mitomycin C with Z-DNA. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 6(3):459-70, 1988.

26. Chen J, Chen X, Bois-Choussy M, Zhu J. Total Synthesis of Ecteinasidin 743. **Journal of the American Chemical Society** 128, 87-89, 2006.
27. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology** 193: 3–34, 2003.
28. Clark MA, Fisher C, Judson I, et al. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med.* 353:701–711, 2005.
29. Cleaver JE. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. **Nature Reviews Cancer** 5: 564-573, 2005.
30. Cline SD, Hanawalt PC. Who's on first in the cellular response to DNA damage? **Nature Reviews** 4:361-372, 2003.
31. Corey EJ, Gin DY, Kania RS. Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743 **Journal of the American Chemical Society** 118(38): 9202-9203, 1996.
32. Corey EJ, Gin DY. A Convergent Enantioselective Synthesis of the Tetrahydroisoquinoline Unit in the Spiro Ring of Ecteinasidin 743. **Tetrahedron Letters** 37(40): 7163-7166, 1996.
33. Cormier JN, Pollock RE. Soft Tissue Sarcomas. **A Cancer Journal for Clinicians** 54 :94-109, 2004.
34. Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie** 85 : 1083–1099, 2003.
35. Cuevas C, Perez M, Martin MJ, Chicharro JL, Fernandez-Rivas C, Flores M, Francesch A, Gallego P, Zarzuelo M, de la Calle F, Garcia J, Polanco C, Rodriguez I, Manzanares I. Synthesis of Ecteinasidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafracin B. **Organic Letters** 2(16): 2545-2548, 2000.

36. D'Incalci M, Erba E, Damia G, Galliera E, Carrassa L, Marchini S, Mantovani R, Tognon G, Fruscio R, Jimeno J, Faircloth GT. Unique Features of the Mode of Action of ET-743. **The Oncologist** 7:210-216, 2002.
37. D'Incalci M, Colombo T, Ubezio P, Nicoletti I, Giavazzi R, Erba E, Ferrarese L, Meco D, Riccardi R, Sessa C, Cavallini E, Jimeno J, Faircloth GT. The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. **European Journal of Cancer** 39: 1920-1026, 2003.
38. Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE. Nonhomologous end joining in yeast. **Annual Review of Genetics**, 39:431-551, 2005.
39. Damia G, Imperatori L, Stefanini M, D'Incalci M. Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents. **International Journal of Cancer** 66(6):779-83, 1996.
40. Damia G, Silvestri S, Carrassa L, Filiberti L, Faircloth GT, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. **International Journal of Cancer** 92(4):583-8, 2001.
41. Damia G, D'Incalci M. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. **European Journal of Cancer** 43:1791-1801, 2007.
42. Das A, Tang KS, Gopalakrishnan S, Waring MJ, Tomasz M. Reactivity of guanine at m5CpG steps in DNA: evidence for electronic effects transmitted through the base pairs. **Chemistry & Biology** 6(7) :461-471, 1999.
43. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature** 447:941-950, 2007.
44. David-Cordonnier MH, Gajate C, Olmea O, Laine W, de la Iglesia-Vicente J, Perez C, Cuevas C, Otero G, Manzanares I, Bailly C, Mollinedo F. DNA and Non-

DNA Targets in the Mechanism of Action of the Antitumor Drug Trabectedin. **Chemistry & Biology** 12: 1201–1210, 2005a.

45. David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Rosu F, Colson P, de Pauw E, Michel S, Tillequin F, Koch M, Hickman JA *et al.* Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: Unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism. **Molecular Cancer Therapeutics** 4(1): 71-80, 2005b.
46. de Boer J, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis** 21(3): 453-460, 2000.
47. de Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & Development** 13:768–785, 1999.
48. De Silva IU, Mc Hugh J, Clingen PH, Hartley JA. Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin. **Nucleic Acids Research** 30(17): 3848-3856, 2002.
49. Delaloge S, Yovine A, Taamma A, Riofrío M, Brain E, Raymond E, Cottu P, Goldwasser F, Jimeno J, Misset JL, Marty M, Cvitkovic E. **Journal of Clinical Oncology** 19: 1248-1255, 2001.
50. Demple B, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** 88 : 11450-11454, 1991.
51. Dianov GL, Sleeth KM , Dianova II, Allinson SL. Repair of abasic sites in DNA. **Mutation Research** 531 : 157–163, 2003.
52. Donald S, Verschoyle RD, Greaves P, et al. Complete protection by high-dose dexamethasone against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the rat. **Cancer Research** 63:5902–5908, 2003.

53. Donald S, Verschoyle RD, Greaves P, Orr S, Jimeno J, Gescher AJ. Comparison of four modulators of drug metabolism as protectants against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the female rat and in hepatocytes in vitro. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 53:305-312, 2004.
54. Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. **Nature** 447:951-958, 2007.
55. Dronkert MLG, Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links. **Mutation Research** 486: 217–247, 2001.
56. Dunn WC, Carrier WL, Regan JD. Effects of an extract from the sea squirt *Ecteinascidia turbinata* on DNA synthesis and excision repair in human fibroblasts. **Toxicol** 20(4):703-8, 1982.
57. Dziegielewska B, Beerman TA, Bianco PR. Inhibition of RecBCD Enzyme by Antineoplastic DNA Alkylating Agents. **Journal of Molecular Biology** 361, 898–919, 2006.
58. Eckhardt SG, Degen D, Faircloth GI, Jimeno J, Von Hoff DD. Activity of ecteinascidin, a novel marine cytotoxic, against primary human tumor colony-forming units. **Proceedings of the American Association for Cancer Research** 37:2791(Abstr), 1996.
59. Endo A, Yanagisawa A, Abe M, Tohma S, Kan T, Fukuyama T. **Journal of the American Chemical Society** 124: 6552-6554, 2002.
60. Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. **European Journal of Cancer** 37 : 97-105, 2001.
61. Erba E, Cavallaro E, Damia G, Mantovani R, Di Silvio A, Di Francesco AM, Riccardi R, Cuevas C, Faircloth GT, D'Incalci M. The unique biological features of

- the marine product Yondelis (ET-743, trabectedin) are shared by its analog ET-637, which lacks the C ring. **Oncology Research** 14(11-12):579-87, 2004.
62. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. **Mutation Research** 461 : 83–108, 2000.
63. Fayette J, Blay JY. Genetic predictors for drug resistance in soft tissue sarcoma: a review of publications in 2004. **Current Opinion in Oncology** 17:370-375, 2005.
64. Fayette J, Coquard IR, Alberti L, Boyle H, Meeus P, Decouvelaere AV, Thiesse P, Sunyach MP, Ranchere D, Blay JY. ET-743: a novel agent with activity in soft-tissue sarcomas. **Current Opinion in Oncology** 18:347–353, 2006.
65. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. **DNA Repair** 3, 959–967, 2004.
66. Fink D, Aebi S, Howell SB. The Role of DNA Mismatch Repair in Drug Resistance. **Clinical Cancer Research** 4: 1-6, 1998.
67. Fishlock D, Williams RM. Synthetic Studies on Et-743. Asymmetric, Stereocontrolled Construction of the Tetrahydroisoquinoline Core via Radical Cyclization on a Glyoxalimine. **Organic Letters** 8(15):3299-3301, 2006.
68. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. **Biochimie** 85 : 1053–1071, 2003.
69. Fortini P, Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short-and long-patch repair subpathways. **DNA Repair** 6: 398-409, 2007.
70. Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. **FEBS Journal** 272, 3231–3240, 2005.

71. Friedberg EC. DNA damage and repair. **Nature** 421:436-40, 2003.
72. Friedman D, Hu Z, Kolb EA, Gorfajn B, Scotto KW. Ecteinascidin-743 Inhibits Activated but not Constitutive Transcription. **Cancer Research** 62: 3377–3381, 2002.
73. Gajate C, An F, Mollinedo F. Differential Cytostatic and Apoptotic Effects of Ecteinascidin-743 in Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry** 277(44): 41580–41589, 2002.
74. Gallego MP, Sarasin A. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. **Biochimie** 85 :1073–1082, 2003.
75. Garcia-Carbonero R, Supko JG, Manola J, et al. Phase II and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 in patients with progressive sarcomas of soft tissues refractory to chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology** 22:1480–90, 2004.
76. Garcia-Carbonero R, Supko JG, Maki RG, Manola J, Ryan DP, Harmon D, Puchalski TA, Goss G, Seiden MV, Waxman A, Quigley MT, Lopez T, Sancho MA, Jimeno J, Guzman C, Demetri GD. Ecteinascidin-743 (ET-743) for Chemotherapy-Naïve Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: Multicenter Phase II and Pharmacokinetic Study. **Journal of Clinical Oncology** 23 (24):5484-5492, 2005.
77. George S, Maki G, Harmon D et al. Phase II study of ecteinascidin-743 (ET-743) given by 3-hour i.v. infusion in patients with soft tissue sarcomas (STS) failing prior chemotherapies. Proceedings of the **American Society for Clinical Oncology** 21: 408a (Abstr), 2002.
78. Grosso F, Dileo P, Sanfilippo R, Stacchiotti S, Bertulli R, Piovesan C, Jimeno J, D’Incalci M, Gescher A, Casali PG. Steroid premedication markedly reduces liver



and bone marrow toxicity of trabectedin in advanced sarcoma. **European Journal of Cancer** 42: 1484-1490, 2006.

79. Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay JY, Le Cesne A, Sanfilippo R, Casieri P, Collini P, Dileo P, Spreafico C, Stacchiotti S, Tamborini E, Tercero JC, Jimeno J, D'Incalci M, Gronchi A, Fletcher JA, Pilotti S, Casali PG. Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. **The Lancet Oncology** 8: 595-602, 2007.
80. Guan Y, Sakai R, Rinehart KL, Wang AH. Molecular and crystal structures of ecteinascidins: potent antitumor compounds from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 10(5):793-818, 1993.
81. Hanawalt PC. Four decades of DNA repair: from early insights to current perspectives. **Biochimie** 85:1043–1052, 2003.
82. Hartmann JT. Systemic treatment options for patients with refractory adult-type sarcoma beyond anthracyclines. **Anticancer Drugs** 18(3):245-54, 2007.
83. Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. **DNA Repair** 6:470-480, 2007.
84. Held-Warmkessel J. Ecteinascidin-743. **Clinical Journal of Oncology Nursing** 7(3):313-319, 2003.
85. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. **DNA Repair** 6:923–935, 2007.
86. Hendriks HR, Fiebig HH, Giavazzi R, Langdon SP, Jimeno JM, Faircloth GT. High antitumour activity of ET743 against human tumour xenografts from melanoma, non-small-cell lung and ovarian cancer. **Annals Oncology** 10: 1233–1240, 1999.

87. Hill GC, Remers WA. Computer simulation of the binding of saframycin A to d(GATGCATC)<sub>2</sub>. **Journal of Medicinal Chemistry** 34(7):1990-8, 1991.
88. Hill JR, Schindler-Horvat JE, Baldwin RC, MacGregor JT, Osborn BL, Donohue SJ, Tyson CA. Toxicity of ecteinascidin 729 (NSC-638718) in CD2F1 mice and beagle dogs. **Proceedings of the American Association for Cancer Research** 35: 467, 1994.
89. Hoeijmakers JHJ. DNA repair mechanisms. **Maturitas** 38:17–23, 2001a.
90. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** 411:366-374, 2001b.
91. Holt TG. Ph.D. Dissertation University of Illinois, Urbana, 1986; **Chem. Abstr.** 106, 193149, 1987.
92. Hsu Y, Lin J. Telomere and telomerase as targets for anti-cancer and regeneration therapies. **Acta Pharmacologica Sinica** 26 (5): 513-518, 2005.
93. Huygh G, Clement PMJ, Dumez H, Schoffski P, Wildiers H, Selleslach J, Jimeno JM, De Wever I, Sciot R, Duck L, Van Oosterom AT. Ecteinascidin-743: Evidence of Activity in Advanced, Pretreated Soft Tissue and Bone Sarcoma Patients. **Sarcoma** 1-11, 2006.
94. Ishikawa K, Ishii H, Saito T. DNA Damage-Dependent Cell Cycle Checkpoints and Genomic Stability. **DNA and Cell Biology** 25(7): 406-411, 2006.
95. Izbicka E, Lawrence R, Raymond E, Eckhardt G, Faircloth G, Jimeno J, Clark G, Von Hoff DD. **Annals of Oncology** 9: 981–987, 1998.
96. Jin S, Gorfajn B, Faircloth G, Scotto KW. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA** 97 : 6775–6779, 2000.

97. Jin W, Metobo S, Williams RM. Synthetic Studies on Ecteinasidin-743: Constructing a Versatile Pentacyclic Intermediate for the Synthesis of Ecteinasidins and Saframycins. **Organic Letters** 5(12): 2095-2098, 2003.
98. Jin W, Williams RM. Synthetic studies on ecteinasidin 743: asymmetric synthesis of the versatile amino acid component. **Tetrahedron Letters** 44, 4635–4639, 2003.
99. Kamiya H. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides. **Nucleic Acids Research** 31(2):517-531, 2003.
100. Kane CM, Linn S. Purification and characterization of an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry** 256, 3405-3414, 1981.
101. Kannouche P, Stary A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. **Biochimie** 85 : 1123–1132, 2003.
102. Kanzaki A, Takebayashi Y, Ren XQ, Miyashita H, Mori S, Akiyama S, Pommier Y. Overcoming Multidrug Drug Resistance in P-Glycoprotein/*MDR1*-overexpressing Cell Lines by Ecteinasidin 743. **Molecular Cancer Therapeutics** 1: 1327-1334, 2002.
103. Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. Elevated and Altered Expression of the Multifunctional DNA Base Excision Repair and Redox Enzyme Ape1/ref-1 in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research** 7: 824–830, 2001.
104. Kelley MR, Kow YW, Wilson III DM. Disparity between DNA Base Excision Repair in Yeast and Mammals: Translational Implications. **Cancer Research** 63, 549–554, 2003.

105. Kotilingam D, Lev DC, Lazar AJF, Pollock RE. Staging Soft Tissue Sarcoma: Evolution and Change. **A Cancer Journal for Clinicians**, 56:282–291, 2006.
106. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, Digiovanna JJ. Xeroderma Pigmentosum, Trichothiodystrophy and Cockayne Syndrome: a Complex Genotype–Phenotype Relationship. **Neuroscience** 145: 1388–1396, 2007.
107. Krogh BO, Symington LS. Recombination Proteins In Yeast. **Annual Review of Genetics** 38:233–71, 2004.
108. Larsen AK, Gilbert C, Chyzak G, Plisov SY, Naguibneva I, Lavergne O, Lesueur-Ginot L, Bigg DCH. Unusual Potency of BN 80915, a Novel Fluorinated E-ring Modified Camptothecin, toward Human Colon Carcinoma Cells. **Cancer Research** 61: 2961–2967, 2001.
109. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics** 99: 167– 181, 2003.
110. Lees-Miller SP, Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. **Biochimie** 85: 1161–1173, 2003.
111. Legarza K, Yang LX. New molecular mechanisms of action of camptothecin-type. **Drugs** 26(5A): 3301-5, 2006.
112. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **Biochimie** 85: 1101–1111, 2003.
113. Lehmann AR. Translesion synthesis in mammalian cells. **Experimental Cell Research** 312:2673-2676, 2006.
114. Lehmann AR, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing JF, Kannouche PL, Green CM. Translesion synthesis:Y-family polymerases and the polymerase switch. **DNA Repair** 6:891-899, 2007.

115. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. **Journal of Molecular Histology** 37: 225–238, 2006.
116. Léonce S, Kraus-Berthier L, Golsteyn RM, David-Cordonnier MH, Tardy C, Lansiaux A, Poindessous V, Larsen AK, Pierré A. **Cancer Research** 66:7203-7210, 2006.
117. Li WW, Takahashi N, Jhanwar S, Cordon-Cardo C, Elisseyeff Y, Jimeno J, Faircloth G, Bertino JR. Sensitivity of Soft Tissue Sarcoma Cell Lines to Chemotherapeutic Agents: Identification of Ecteinascidin-743 as a Potent Cytotoxic Agent. **Clinical Cancer Research** 7: 2908–2911, 2001.
118. Lichter W, Lopez DM, Wellham LL, Sigel MM. Ecteinascidia turbinata extracts inhibit DNA synthesis in lymphocytes after mitogenic stimulation by lectins. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 150(2):475-8, 1975.
119. MacKenzie MJ, Hirte HW, Siu LL, Gelmon K, Ptaszynski M, Fisher B, Eisenhauer E. A phase I study of OSI-211 and cisplatin as intravenous infusions given on days 1, 2 and 3 every 3 weeks in patients with solid cancers. **Annals of Oncology** 15: 665–670, 2004.
120. Markman M. New, expanded, and modified use of approved antineoplastic agents in ovarian cancer. **The oncologist** 12(2):186-90, 2007.
121. Martinez EJ, Owa T, Schreiber SL, Corey EJ. Phthalascidin, a synthetic antitumor agent with potency and mode of action comparable to Ecteinascidin 743. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 96: 3496–3501, 1999.

122. Martinez EJ, Corey EJ. A new, more efficient, and effective process for the synthesis of a key pentacyclic intermediate for production of ecteinascidin and phthalascidin antitumor agents. **Organic Letters** 2(7): 993- 996, 2000.
123. Martinez EJ , Corey EJ, Owa T. Antitumor activity- and gene expression-based profiling of ecteinascidin Et 743 and phthalascidin Pt 650. **Chemistry & Biology** 8: 1151-1160, 2001.
124. Martinez N, Sanchez-Beato M, Carnero A, Moneo V, Tercero JC, Fernandez I, Navarrete M, Jimeno J, Piris MA. Transcriptional signature of Ecteinascidin 743 (Yondelis,Trabectedin) in human sarcoma cells explanted from chemo-naive patients. **Molecular Cancer Therapeutics** 4(5): 814-823, 2005.
125. Meco D, Colombo T, Ubezio P, Zucchetti M, Zafaroni M, Riccardi A, Faircloth G, Jimeno J, D'Incalci M, Riccardi R. Effective combination of ET-743 and doxorubicin in sarcoma: preclinical studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 52:131-138, 2003.
126. Minuzzo M, Marchini S, Broggin M, Faircloth G , D'Incalci M , Mantovani R. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 97 (12): 6780–6784, 2000.
127. Minuzzo M, Ceribelli M, Pitarque-Marti M, Borrelli S, Erba E, diSilvio A, D'Incalci M, Mantovani R. Selective Effects of the Anticancer Drug Yondelis (ET-743) on Cell-Cycle Promoters. **Molecular Pharmacology** 68(5):1496–1503, 2005.
128. Modesti M, Kanaar R. DNA repair: Spot(light)s on chromatin. **Current Biology** 11(6) : 229–232, 2001.
129. Moneo V, Serelde BG, Fominaya J, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Romero L, Sánchez-Beato M, Cigudosa JC, Tercero JC, Piris MA, Jimeno J, Carnero A. Extreme sensitivity to Yondelis (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma

- cell lines correlates with mutated p53. **Journal of Cellular Biochemistry** 1;100(2):339-48, 2007.
130. Moore BM, Seaman FC, Hurley LH. NMR-Based model of an ecteinascidin 743-DNA adduct. **Journal of the American Chemical Society** 119, 5475-5476, 1997.
131. Moore BM, Seaman FC, Wheelhouse RT, Hurley LH. Mechanism for the catalytic activation of ecteinascidin 743 and its subsequent alkylation of guanine N2. **Journal of the American Chemical Society** 120, 2490-2491, 1998.
132. Morrison AJ, Shen X. DNA repair in the context of chromatin. **Cell Cycle** 4(4): 568-571, 2005.
133. Moro S, Beretta GL, Dal Ben D, Nitiss J, Palumbo M, Capranico G. **Biochemistry** 43: 7503, 2004.
134. Newman DJ, Cragg GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products** 67: 1216-38, 2004.
135. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers NG, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, Kanaar R. The Structure-Specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. **Molecular and Cellular Biology** 24: 5776-5787, 2004.
136. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Current Opinion in Pharmacology** 4: 386-91, 2004.
137. O'Hanlon LH. **Journal of the National Cancer Institute** 98(10): 662-663, 2006.

138. Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols** 1(1): 23-29, 2006.
139. Paques F, Haber JE. Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 63(2): 349–404, 1999.
140. Paz-Ares L, Rivera-Herreros F, Díaz-Rubio E, García M, Casado E, Cubedo R, Gravalos C, Alfaro V, Gómez J, Izquierdo MA, Tabernero J. Phase II study of trabectedin in pretreated patients with advanced colorectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer** ;6(7):522-8, 2007.
141. PharmaMar website [<http://www.pharmamar.com/>].
142. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. **Current Biology** 14, R546 R551, 2004.
143. Petrussek RL, Anderson GL, Garner TF, Fannin QL, Kaplan DJ, Zimmer SG, Hurley LH. Pyrrol- [1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the in vitro deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycins A and B. **Biochemistry** 20: 1111-1119, 1981.
144. Petrussek RL, Uhlenhopp EL, Duteaug N, Hurley LH. Reaction of anthramycin with DNA : Biological cConsequences of DNA damage inn and Xeroderma Pigmentosum cell lines. The **Journal of Biological Chemistry** 257(11): 6207-6216, 1982.
145. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Products Reports** 21(4):519-38, 2004.
146. Poindessous V, Koepfel F, Raymond E, Comisso M, Waters SJ, Larsen AK. Marked Activity of Irofulven toward Human Carcinoma Cells: Comparison with Cisplatin and Ecteinascidin. **Clinical Cancer Research** 9 : 2817–2825, 2003.



147. Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn K. DNA sequence and structure selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry** 35: 13303-13309, 1996.
148. Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular selectivity and cellular. **Drug Resistance Updates** 2, 307, 1999.
149. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer** 6(10): 789-802, 2006.
150. Prakash S, Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutation Research** 45 :13–24, 2000.
151. Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic Translesion Synthesis DNA Polymerases: Specificity of Structure and Function. **Annual Review of Biochemistry** 74:317–53, 2005.
152. Puthongking P, Patarapanich C, Amnuoyopol S, Suwanborirux K, Kubo A, Saito N. Chemistry of Ecteinascidins. Part 2. 1) Preparation of 6-O-Acyl Derivatives of Stable Ecteinascidin and Evaluation of Cytotoxicity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 54(7): 1010-1016, 2006.
153. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Research** 63:6221–8, 2003.
154. Ragland BD, Bell WC, Lopez RR, Siegal GP. Cytogenetics and Molecular Biology of Osteosarcoma. **Laboratory Investigation** 82(4): 365-373, 2002.

155. Rao K, Lown J. DNA sequences selectivities in the covalent bonding of antibiotic saframycins Mx1, Mx3, A, and S deduced from MPE-Fe(II) footprinting and exonuclease III stop assays. **Biochemistry** 31(48):12076-82, 1992.
156. Rattray AJ, Strathern JN. Homologous Recombination Is Promoted by Translesion Polymerase Pol $\eta$ . **Molecular Cell** 20: 658-659, 2005.
157. Reichardt P, Nielsen OS, Bauer S, Hartmann JT, Schoffski P, Christensen TB, Pink D, Daugaard S, Marreaud S, Van Glabbeke M, Blay JY. Exatecan in pretreated adult patients with advanced soft tissue sarcoma: Results of a phase II – Study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. **European Journal of Cancer** 43:1017-1022, 2007.
158. Reid JM, Walker DL, Ames MM. Preclinical pharmacology of ecteinascidin 729, a marine natural product with potent antitumor activity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 38: 320–334, 1996.
159. Reid JM, Kuffel MJ, Ruben SL, Morales JJ, Rinehart KL, Squillace DP, Ames MM. Rat and Human Liver Cytochrome P-450 Isoform Metabolism of Ecteinascidin 743 Does Not Predict Gender-dependent Toxicity in Humans. **Clinical Cancer Research** 8 : 2952–2962, 2002.
160. Riccardi A, Meco D, Ubezio P, et al. Combination of trabectedin and irinotecan is highly effective in a human rhabdomyosarcoma xenograft. *Anticancer Drugs* 16:811–815, 2005.
161. Rinehart KI, Holt TG, Fregeau NI, Keifer PA, Wilson GR, Perun jr TJ, Sakai R, Thompson AG, Stroh JG, Shield LS, Seigler DS. Bioactive compounds from ayuatic and terrestrial sources. **Journal of Natural Products** 53(4): 771-792, 1990a.
162. Rinehart KL, Holt TG, Fregeau NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH, Martin DG. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents

- from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Organic Chemistry** 55: 4512-4515, 1990b.
163. Rinehart KL, Holt TG. **U.S. Patent** 5,089,273, Feb 18, 1992; Chem. Abstr, 117, 63016q, 1992.
164. Rinehart KL, Gravalos LG, Faireboth G, Jimeno J. ET 743: preclinical antitumor development of a marine derived natural product. **Proceedings of the American Association for Cancer Research** 36: 2322 (Abstr), 1995.
165. Rinehart KL. Antitumor compounds from tunicates. **Medicinal Research Reviews** 20(1):1-27, 2000.
166. Robertson KA, Bullock HA, Xu Y, Tritt R, Zimmerman E, Ulbright TM, Foster RS, Einhorn LH, Kelley MR. Altered Expression of Ape1/ref-1 in Germ Cell Tumors and Overexpression in NT2 Cells Confers Resistance to Bleomycin and Radiation. **Cancer Research** 61, 2220–2225, 2001.
167. Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, Jasin M, Masson JY. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. **EMBO Journal** 25, 222–231, 2006.
168. Ryan DP, Supko JG, Eder JP, Seiden MV, Demetri G, Lynch TJ, Fischman AJ, Davis J, Jimeno J, Clark JW. Phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 administered as a 72-hour continuous intravenous infusion in patients with solid malignancies. **Clinical Cancer Research** 7: 231–242, 2001.
169. Sakai R, Rinehart KL, Guan Y, Wang HJ. Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: crystal structures and activities in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 89: 11456-11460, 1992.
170. Sakai R, Jares-Erijman EA, Manzanares I, Elipe MVS, Rinehart KL. Ecteinascidins: Putative Biosynthetic Precursors and Absolute Stereochemistry **Journal of the American Chemical Society** 118(38): 9017 -9023, 1996.

171. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research** 544 : 99–106, 2003.
172. Sarasin A, Monier R. DNA repair pathways and associated human diseases. **Biochimie** 85, 1041, 2003.
173. Sarasin A, Stary A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. **DNA Repair** 6:265–269, 2007.
174. Sasaki T, Uchida NA, Uchida H, Takasuka N, Kamiya H, Endo Y, Tanaka M, Hayashi T, Shimizu Y. Antitumor activity of aqueous extracts of marine animals. **Journal of Pharmacobiodyn** 8(11):969-74, 1985.
175. Sastry M, Fiala R, Lipman R, Tomasz M, Patel DJ. **Journal of Molecular Biology** 247:338-359, 1995.
176. Schoffski P, Casali PG, Taron M, VanOosterom AT, Judson IR, Grosso F, Blay J-Y, Maki RG, Tercero JC, Jimeno JM, Rosell R. 42nd **Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology**, June 2–6, 2006, Atlanta, GA, abstr. 9522, 2006.
177. Schöffski P, Wolter P, Clement P, Sciot R, De Wever I, Wozniak A, Stefan C, Dumez H. Trabectedin (ET-743): evaluation of its use in advanced soft-tissue sarcoma. **Future Oncology** 3(4):381-392, 2007.
178. Scotlandi K, Perdichizzi S, Manara MC, Serra M, Benini S, Cerisano V, Strammiello R, Mercuri M, Reverter-Branchat G, Faircloth G, D’Incalci M, Picci P. **Clinical Cancer Research** 8, 3893- 390, 2002.
179. Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. **Molecular Interventions** 1(2): 117-125, 2001.

180. Sharma RA, Dianov GL. Targeting base excision repair to improve cancer therapies. **Molecular Aspects of Medicine** 28: 345-374, 2007.
181. Sigel MM, Wellham LL, Lichter W, Dudeck E, Gargus L, Lucas LH. *Food-Drugs From the Sea, Proceedings 1969*; Youngken H W, Ed. Marine Technology Society, Washington DC, pp 281-295, 1970. In Rinehart KL, Holt TG, Fregeau NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH, Martin DG. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Organic Chemistry** 55: 4512-4515, 1990b.
182. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. Marine natural products as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics** 4(2): 333-342, 2005.
183. Simoens C, Korst AEC, De Pooter CMJ, Lambrechts HAJ, Pattyn GGO, Faircloth GT, Lardon F, Vermorken JB. In vitro interaction between Ecteinascidin 743 (ET-743) and radiation, in relation to its cell cycle effects. **British Journal of Cancer** 89: 2305 – 2311, 2003.
184. Skorupa A, Beldner M, Kraft A, Montero AJ. Fatal Rhabdomyolysis as a Complication of ET-743 (Yondelis) Chemotherapy for Sarcoma. **Cancer Biology and Therapy** 24, 6(7), 2007.
185. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research** 531: 231–251, 2003.
186. Smellie M, Bose DS, Thompson AS, Jenkins TC, Hartley JA, Thurston DE. Sequence-Selective Recognition of Duplex DNA through Covalent Interstrand Cross-Linking: Kinetic and Molecular Modeling Studies with Pyrrolobenzodiazepine Dimers. **Biochemistry** 42, 8232-8239, 2003.
187. Sparidans RW, Rosing H, Hillebrand MJX, Lopez-Lazaro L, Jimeno JM, Manzanares I, van Kesteren C, Cvitkovic E, van Oosterom AT, Schellens JHM,

- Beijnen JH. Search for metabolites of ecteinascidin 743, a novel, marine-derived, anti-cancer agent, in man. **Anti-Cancer Drugs** 12(8):653-666, 2001.
188. Sweasy JB, Lang T, DiMaio D. Is Base Excision Repair a Tumor Suppressor Mechanism? **Cell Cycle** 5:3, 250-259, 2006.
189. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. **Nature Medicine** 7(5): 584-590, 2001.
190. Taamma A, Misset JL, Riofrio M, et al: Phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin- 743, a new marine compound, administered as a 24-hour continuous infusion in patients with solid tumors. **Journal of Clinical Oncology** 19:1256- 1265, 2001.
191. Takahashi N, Li WW, Banerjee D, Scotto KW, Bertino JR. Sequence-dependent Enhancement of Cytotoxicity Produced by Ecteinascidin 743 (ET-743) with Doxorubicin or Paclitaxel in Soft Tissue Sarcoma Cells. **Clinical Cancer Research** 7: 3251–3257, 2001.
192. Takahashi N, Li WW, Banerjee D, Guan Y, Wada-Takahashi Y, Brennan MF, Chou TC, Scotto KW, Bertino JR. Sequence-dependent Synergistic Cytotoxicity of Ecteinascidin-743 and Paclitaxel in Human Breast Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. **Cancer Research** 62: 6909–6915, 2002.
193. Takahashi Y, Fuwa H, Kaneko A, Sasaki M, Yokoshima S, Koizumi H, Takebe T, Kan T, Iwatsubo T, Tomita T, Natsugari H, Fukuyama T. Novel c secretase inhibitors discovered by library screening of in-house synthetic natural product intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16: 3813-3816, 2006.
194. Takebayashi Y, Pourquier P, Yoshida A, Kohlhagen G, Pommier Y. Poisoning of human DNA topoisomerase I by ecteinascidin 743, an anticancer drug that selectively alkylates DNA in the minor groove. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 96: 7196–7201, 1999.

195. Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Konzaki A, Akitama S, Popescu N, Kraemer KH, Pommier Y. Antiproliferative activity of Ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. **Nature Medicine** 7(8):961-6, 2001a.
196. Takebayashi Y, Goldwasser F, Urasaki Y, Kohlhagen G, Pommier Y. Ecteinascidin 743 Induces Protein-linked DNA Breaks in Human Colon Carcinoma HCT116 Cells and Is Cytotoxic Independently of Topoisomerase I Expression. **Clinical Cancer Research** 7: 185–191, 2001b.
197. Tewari D, Saffari B, Cowan C, Wallick AC, Koontz MZ, Monk BJ. Activity of trabectedin (ET-743, Yondelis) in metastatic uterine leiomyosarcoma. **Gynecologic Oncology** 102: 421-424, 2006.
198. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. **Current Opinion in Pharmacology** 5:388–393, 2005.
199. Twelves C, Hoekman K, Bowman A, Vermorken JB, Anthony A, Smyth J, van Kesteren C, Beijnen JH, Uiters J, Wanders J, Gomez J, Guzman C, Jimeno J, Hanauske A. **European Journal of Cancer** 39, 1842-1851, 2003.
200. Valoti G, Nicoletti MI, Pellegrino A, et al. Ecteinascidin-743, a new marine natural product with potent antitumor activity on human ovarian carcinoma xenografts. **Clinical Cancer Research** 4:1977–1983, 1998.
201. Venkatesan RN, Bielas JH, Loeb LA. Generation of mutator mutants during carcinogenesis. **DNA Repair** 5: 294 –302, 2006.
202. Verweij J, Lee SM, Ruka W, et al: Randomized phase II study of docetaxel versus doxorubicin in first- and second-line chemotherapy for locally advanced or metastatic soft tissue sarcomas in adults: A study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer soft tissue and bone sarcoma group. **Journal of Clinical Oncology** 18:2081-2086, 2000.

203. Wang D, Luo M, Kelley MR. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: Enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. **Molecular Cancer Therapeutics** 3(6) :679-686, 2004.
204. Wang XZ, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. **DNA Repair** 3: 1063–1069, 2004.
205. Watson NB, Mukhopadhyay S, McGregor WG. Translesion DNA replication proteins as molecular targets for cancer prevention. **Cancer Letters** 241: 13–22, 2006.
206. Wilson III DM, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. **DNA Repair** 6: 544 –559, 2007.
207. Wright AE, Forleo DA, Gunawardana GP, Gunasekera SP, Koehn FE, McConnell OJ. Antitumor Tetrahydroisoquinoline Alkaloids from the Colonial Ascidian *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Organic Chemistry** 55: 4508-4512, 1990.
208. Wu F, Lin X, Okuda T, Howell SB. DNA Polymerase  $\beta$  Regulates Cisplatin Cytotoxicity, Mutagenicity, and The Rate of Development of Cisplatin Resistance. **Cancer Research** 64, 8029–8035, 2004.
209. Wykes SM, Piasentin E, Joiner MC, Wilson GD, Marples B. Low-Dose Hyper-radiosensitivity is not Caused by a Failure to Recognize DNA Double-Strand Breaks. **Radiation Research** 165, 516–524, 2006.
210. Yarden RI, Papa MZ. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. **Molecular Cancer Therapeutics** 5(6) :1396-1404, 2006.



211. Yovine ARM, Riofrio M, Brain E et al. Ecteinascidin (ET-743) given as a 24 hour (h) intravenous continuous infusion (i.v.CI) every 3 weeks: results of a phase II trial in patients with pretreated soft tissue sarcomas. **Proceedings of the American Society for Clinical Oncology** 20: 363a (Abstr), 2001.
212. Yovine A, Riofrio M, Blay JY, Brain E, Alexandre J, Kahatt C, Taamma A, Jimeno J, Martin C, Salhi Y, Cvitkovic E, Misset JL. Phase II Study of Ecteinascidin-743 in Advanced Pretreated Soft Tissue Sarcoma Patients. **Journal of Clinical Oncology** 22(5): 890-899, 2004.
213. Zelek L, Yovine A, Brain E, Turpin F, Taamma A, Riofrio M, Spielmann M, Jimeno J, Misset JL. A phase II study of Yondelis (trabectedin, ET-743) as a 24-h continuous intravenous infusion in pretreated advanced breast cancer. **British Journal of Cancer** 94, 1610 – 1614, 2006.
214. Zewail-Foote M, Hurley LH. Ecteinascidin 743: A Minor Groove Alkylator That Bends DNA toward the Major Groove. **Journal of Medicinal Chemistry** 42: 2493, 1999.
215. Zewail-Foote M, Li VS, Kohn H, Bearss D, Guzman M, Hurley LH. The inefficiency of incisions of Ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent. **Chemistry & Biology** 8(11):1033-49, 2001.

# IX. ANEXO

# Nature's Lessons to Design an Effective, Rational and Selective Drug for Soft Tissue Sarcoma Treatment: The Ecteinascidins

J. A. P. Henriques<sup>1,2,3,\*</sup>, D. G. Soares<sup>1,2</sup>, D. Bonatto<sup>1,2</sup>, M. Salvador<sup>1</sup>, G. Schwartzmann<sup>4</sup> and A. K. Larsen<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnologia/Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, <sup>3</sup>Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil, <sup>4</sup>Serviço de Oncologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, <sup>5</sup>Group of Molecular and Clinical Cancer Therapeutics, INSERM U673, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

Received: ??? ??, 2005; Accepted: ??? ??, 2005

**Abstract:** Soft tissue sarcomas (STSs) belong to a rare, heterogeneous family of malignancies of mesenchymal origin. Inoperable or metastatic sarcomas typically show low responsiveness to conventional chemotherapy probably due to overexpression of several genes related to cell cycle control, cell maintenance, and DNA repair. The ecteinascidins (ETs) are potent and selective antitumor agents isolated from marine tunicades from the Caribbean, *Ecteinascidia turbinata*. Of the numerous ETs that have been isolated, ET-743 (Yondelis™, Trabectedin™) is the most promising compound for treatment of STSs. ET-743 is an alkaloid composed of three fused tetrahydroisoquinoline rings (A, B and C subunits) and is structurally related to the DNA-reactive saframycins. While the A and B subunits of ET-743 provide the scaffold for DNA recognition and binding, the C subunit makes only limited contacts with DNA. It has been proposed that ET-743 can also bind to the major endonucleases involved in base (BER) and nucleotide (NER) excision DNA repair, resulting in cytotoxic DNA-ET-743-protein ternary complexes. Interestingly, absence of the C subunit in the ET molecule results in distinct pharmacological activities when compared to ET-743 and could lead to the design of more potent and selective ET-derived drugs for STSs treatment.

**Keywords:** Ecteinascidins, ET-743, chemical structure, soft tissue sarcomas, NER and BER.

## 1. INTRODUCTION

Soft tissue sarcomas (STSs) are rare tumors that account for approximately 5% and 1% of malignancies in children and adults, respectively [1]. They comprise a wide variety of histological subtypes, clearly separated in both age groups: rhabdomyosarcomas represent half in childhood, whereas malignant fibrohistiocytomas, liposarcomas and leiomyosarcomas are predominant in adults [1]. The rareness, along with the considerable heterogeneity, explains the difficulty in drawing clear guidelines relative to the optimal management of STSs [1]. Currently, despite adequate control of the primary tumor, more than half of all patients die within 5 years of the primary diagnosis, as a result of widespread metastatic disease [2]. Inoperable or metastatic sarcomas of osseous origin, such as osteogenic and Ewing's sarcomas, are generally fatal, typically showing low responsiveness to chemo- or radiotherapy [2-6]. The resistance of STSs to chemotherapy is due to the overexpression of several genes related to cell cycle control, cell maintenance, and DNA repair [3-6]. In this sense, the search for new anticancer agents that are able to circumvent the above mentioned

drug resistance mechanisms are a priority in the experimental treatment of STSs.

Anticancer agents may be derived either from the isolation of an active lead compound occurring spontaneously in nature or by chemical synthesis in the laboratory [7]. Until recently, the tradition in natural product-derived anticancer drug development was to rely almost exclusively on the screening of terrestrial sources (plant extracts and fermentation products) for their cytotoxic properties [7]. There are many examples of successful drugs being derived from natural sources, which have had a profound impact on the natural history of various types of cancer [8-10]. Traditionally, higher plants and terrestrial microorganisms have proven to be the richest sources of natural drugs that are indispensable for treatment of fatal diseases such as cancer. Well-known examples of plant-derived anticancer drugs include paclitaxel (taxol), from *Taxus brevifolia*; etoposide (vepesid), derived by partial synthesis from the lignan podophyllotoxin isolated from *Podophyllum peltatum*; and irinotecan, that was obtained by optimizing the structure of the alkaloid camptothecin from *Camptotheca acuminata*. Examples from bacterial sources include doxorubicin and bleomycin from various *Streptomyces* strains [8]. The treatment of lymphomas and acute leukemias with the use of combination chemotherapy, including anthracyclines and vinca alkaloids, are examples

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Biotecnologia/Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil; Tel: +55-51-3316-6069; Fax: +55-51-3316-7309; E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

of the contribution of nature [7]. Recently, in search for anticancer agents with novel and original mechanisms of action, natural products from marine organisms have also been included as a potential source for drug development. An increasing number of substances originating from marine organisms are currently being developed towards clinical trials [10-12].

Serious attempts to tap the vast potential of marine organisms as sources of bioactive metabolites that may be used directly or serve as lead structures for drug development started in the late 1960s. The discovery of sizeable quantities of prostaglandins, which had just been discovered as important mediators involved in inflammatory diseases, fever and pain, in the gorgonian *Plexaura homomalla* by Weinheimer and Spraggins [13], is usually considered as the 'take-off point' of any serious search for 'drugs from the sea' [13]. Interestingly, unusual nucleosides were isolated from marine sponge *Cryptotethya cryta* already in the 1950s and served as lead structures for the development of commercially important anti-viral drugs such as Ara-A (acyclovir) and the anticancer drug for leukemia, Ara-C (cytosar-U, cytarabine) [8, 14]. Also one marine anti-inflammatory compound is marketed as an additive in high-end cosmetics (pseudopterosin C from the Caribbean soft coral *Pseudopterogorgia elisabethae*) [14].

It is interesting to note that the majority of marine natural products currently in use in clinical trials or under pre-clinical evaluation are produced by sponges, tunicates, molluscs or bryozoans [8]. The wealth of bioactive metabolites isolated from soft-bodied, sessile or slow moving marine metazoans that usually lack morphological defense structures such as spines or a protective shell is not merely a coincidence but reflects the ecological importance of these constituents for the respective metazoans [8]. It has been repeatedly shown that chemical defense through accumulation of toxic or distasteful natural products is an effective strategy to fight off potential predators (e.g. fishes) or to force back neighbors competing for space [8]. Taking the described ecological importance of marine natural products into consideration, it is hardly a surprise that the majority of drug candidates from the sea has so far been isolated from metazoans that thrive in tropical or subtropical seas where the grazing pressure by predators is higher than in any other ecosystem of the world. Under such severe selective pressures, only will survive those organisms that can rely on effective means of chemical defense. Interestingly, microorganisms associated with their metazoan hosts have also been identified as a source for bioactive metabolites [15-18]. Most (if not all) marine organisms harbor microorganisms that include bacteria, cyanobacteria and fungi within their tissues where they reside in the extra- and intracellular space [19]. In some cases, these associated microorganisms may constitute up to 40% of the biomass of sponges [20, 21]. In this regard, several strains of *Vibrio* associated with the sponge *Dysidea* sp. were studied, and it was found that these bacteria are able to synthesize cytotoxic as well as antibacterial tetrabromodiphenyl ethers [22]. Certain amino acid diketopiperazines have also been isolated from the sponge-associated bacterium *Micrococcus* sp. [23]. Surfactin-like depsipeptides were originally isolated from *Bacillus pumilus*-associated marine sponges [24] as well as

ubiquinone-8, isolated from the culture broth of *Alteromonas* sp. that is associated with the sponge *Halichondria okadai* [25].

Concerning the bacteriological aspects and the richness of their natural product chemistry, ascidians can be compared to sponges [8, 26-28]. Both organisms are filter feeders, harbor symbiotic bacteria and have been the source of numerous biologically active compounds that frequently resemble bacterial metabolites [29]. Ascidians are also conspicuous members of marine fouling and benthic communities. Their soft-bodied morphology provides ascidians with little obvious structural defense from predation [30-33]. Therefore, chemistry has been implicated in defending ascidians from predators. Ascidians have been a rich source of marine natural products [34], and the ecological roles of these metabolites have been investigated in a few studies [35-37]. Some ascidian larvae also possess anti-predatory chemical defenses [38-41]. Similarities have been noted in the chemistry of adults and larvae [33], particularly in tropical compound ascidians.

One ascidian's species, *Ecteinascidia turbinata*, has been studied widely by its secondary metabolites, which have potent cytotoxic properties [42]. Characteristically, *E. turbinata* is a colonial tunicate from the family Perophoridae found in the Caribbean and Mediterranean Seas [43]. As an important component of the benthic ecology of the Caribbean mangroves, *E. turbinata* has been the subject of various studies examining settlement, species succession and larval behavior [44-46]. The colony-forming individuals, or zooids, are approximately 30 mm in length and are linked by a basal vessel termed the stolon. This creeping structure allows (i) blood flow throughout the colony, (ii) buds to form new zooids during asexual reproduction and (iii) acts as a storage organ during colony regression. Embryos are brooded in the zooid and released as larvae when fully developed. By its biological characteristics, *E. turbinata* has become a model for ecological chemistry studies, specially those regarding secondary metabolites production.

## 2. THE DISCOVERY AND CHEMICAL ANALYSES OF ECTEINASCIDINS

### 2.1. *E. Turbinata* Extracts

The crude aqueous ethanol extracts of *E. turbinata* were first reported to possess *in vivo* antitumor activity by Sigel *et al.* [47]. In addition, the effect of this extract resulted in a 44% reduction on DNA excision repair in human skin fibroblast cultures and accumulation of single-strand DNA breaks (SSBs) [48]. The effect on DNA excision repair in ultraviolet light-irradiated fibroblasts was measured by the bromodeoxyuridine photolysis assay, thymine dimmer chromatography, and DNA SSBs analysis on alkaline sucrose gradients [49]. Aqueous extract also revealed relatively high inhibition ratios (over 60%) against transplanted sarcoma in mice [49], as well as immunomodulatory effects [50-52]. Followed by these pioneer studies, a number of research groups worked on the isolation of the active constituents of the extract [53]. In 1986, it was suggested that the active compounds contained three tetrahydroisoquinoline rings [53, 54]. The analyses was then extended and the results indicated that the compounds

are related to the safracin class of antitumor antibiotics [53]. A butanol partition of a crude methanol-toluene (3:1) extract of *E. turbinata* was found to prolong the life span of mice with murine leukemia by 45% [53].

## 2.2. Purification and Chemical Studies of *E. Turbinata* Extract Constituents

The purification and identification of active components from *E. turbinata* extracts was not completed until 1990 [53, 55, 56]. The delay in the isolation of active compounds from *E. turbinata* extracts could be explained by the small amounts of active substances found in the ascidian tissues [0.01 to 1 part per million (ppm) range on a wet-weight] and the improvement of chemical analytical technology occurring at the end of the 20<sup>th</sup> century, which allowed the study of very few quantities of material. The chemical structures of the active substance from *E. turbinata* extracts were assigned primarily by fast atom bombardment mass spectrometry (FABMS) and nuclear magnetic resonance (NMR) studies. Pseudomolecular formulas of ETs were assigned by high resolution FABMS (HRFABMS) and ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis), which identified the sulfur atom. Molecular formulas were assigned by HRFABMS. The results of all these analyses indicated a new class of molecules termed ecteinascidins [ETs, Figs. 1 (compounds 1 to 12) and 2A], a tetrahydroisoquinoline derivative structurally related to the safracins, saframycins, and naphthyridinomycins from microbes, as well as the sponge metabolites, the renieramycins and lenomomycin (Fig. 2 and compounds 13 to 19). Until now, tetrahydroisoquinoline antibiotics include more than 55 natural products that show antitumor, antimicrobial, and other biological activities [57]. Since the discovery of renieramycins from a Mexican marine sponge *Reniera* sp. by Frinke and Faulkner [58], more than 20 tetrahydroisoquinoline compounds have been isolated from metazoans [59-67]. Additionally, more than 12 ETs molecules have been identified from extracts of *E. turbinata* and *Ecteinascidia thurstoni* (Fig. 1 and compounds 1 to 12).

The three tetrahydroisoquinoline units and their aromatic ring (A, B, C) substituents of ETs were identified and combined into partial formulas by Holt [50] (Fig. 3A). These formulas were later corrected by Wright *et al.* [53] and by Rinehart *et al.* [55] and incorporated into consensus structures based on the correct formulas (Fig. 3A and 3B). The relative stereochemistry of ETs for most of the stereocenters in the A-B unit was assigned by NMR data [53, 55]. The crystal structures of some ETs, including ET-743 (4), completed the unambiguous assignment of relative stereochemistry, specially at the difficult quaternary C-1' (Figs. 3B and 3C). Although the X-ray diffraction data did not assign the absolute stereochemistry, it was assumed to be the same as in saframycin A (15) [65]. The determination of ETs' structure was crucial for the researches related to the mode of action of these drugs in both *in vitro* and *in vivo* biological models.

## 3. MECHANISM OF ACTION OF ETs: *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDIES

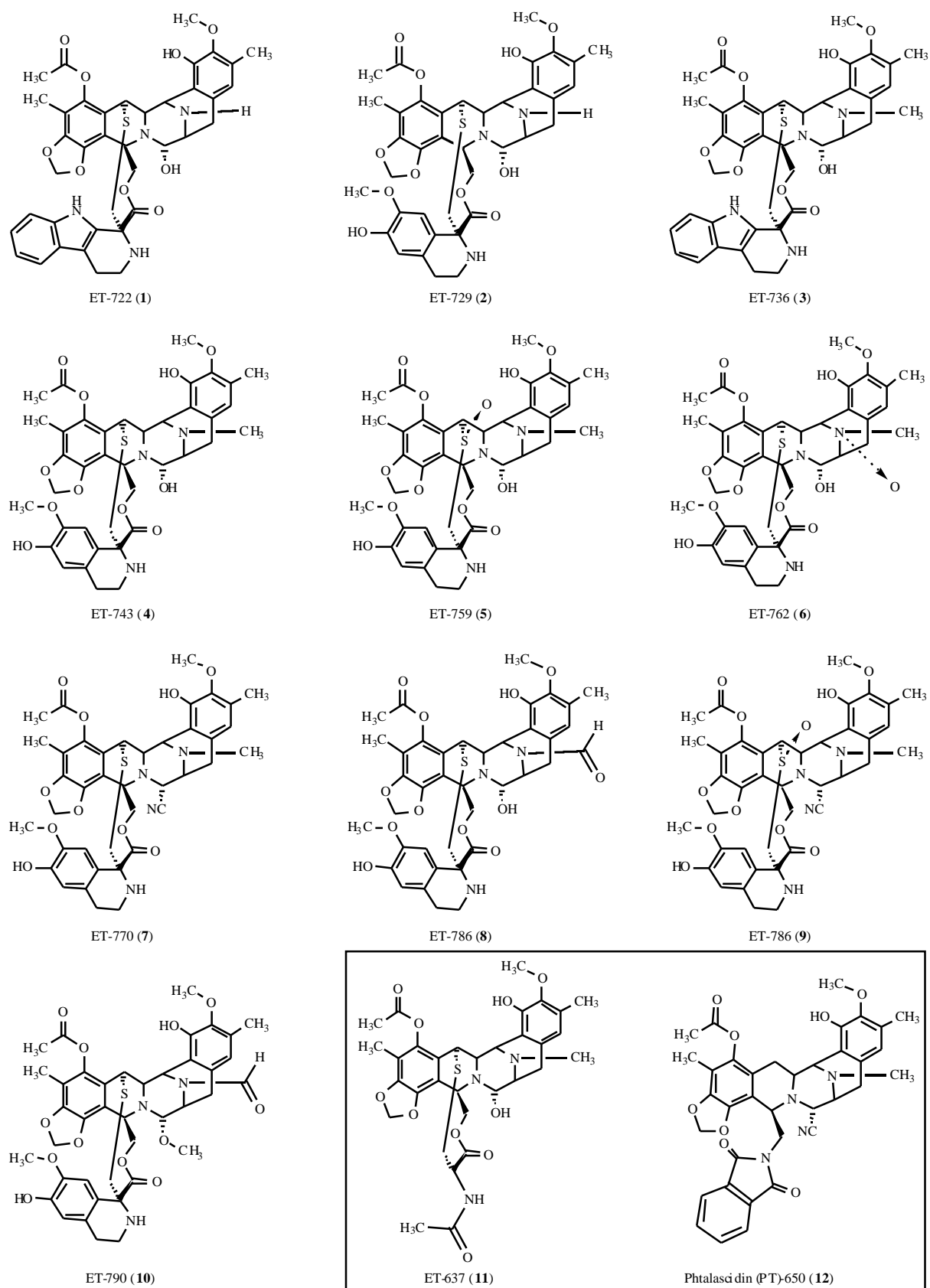
The best-studied ET-743 (4) molecule has shown antitumor activities in both *in vitro* and *in vivo* models [55,

64, 68-70], including sarcomas, having low or no cross-resistance with several standard chemotherapeutic agents [69, 71]. Because of these promising data, the molecular and cytotoxic mechanisms of ET-743 (4) have been deeply investigated [72-75]. In addition, there is a strong clinical interest in evaluating the efficacy of ET-743 (4) in combination with other anticancer drugs [76] and in comparing the activity spectrum toward many different human tumor cell lines with other antitumoral agents [77]. Other ETs, like ET-770 (7) and ET-786 (9), have potent cytotoxic activity, exhibiting IC<sub>50</sub> values of 2.5 and 7.6 nM against the breast cancer cells and of 0.034 and 0.15 μM against nasopharynx carcinoma cells, respectively [78]. Moreover, ET-770 (7) and ET-786 (9) showed antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.13 and 2.0 μM, respectively [78]. The synthetic ET-analogues, PT-650 (12) and saframycin A-derivatives, have a high activity against human sarcoma cells *in vitro* with single-digit picomolar potency [79, 80].

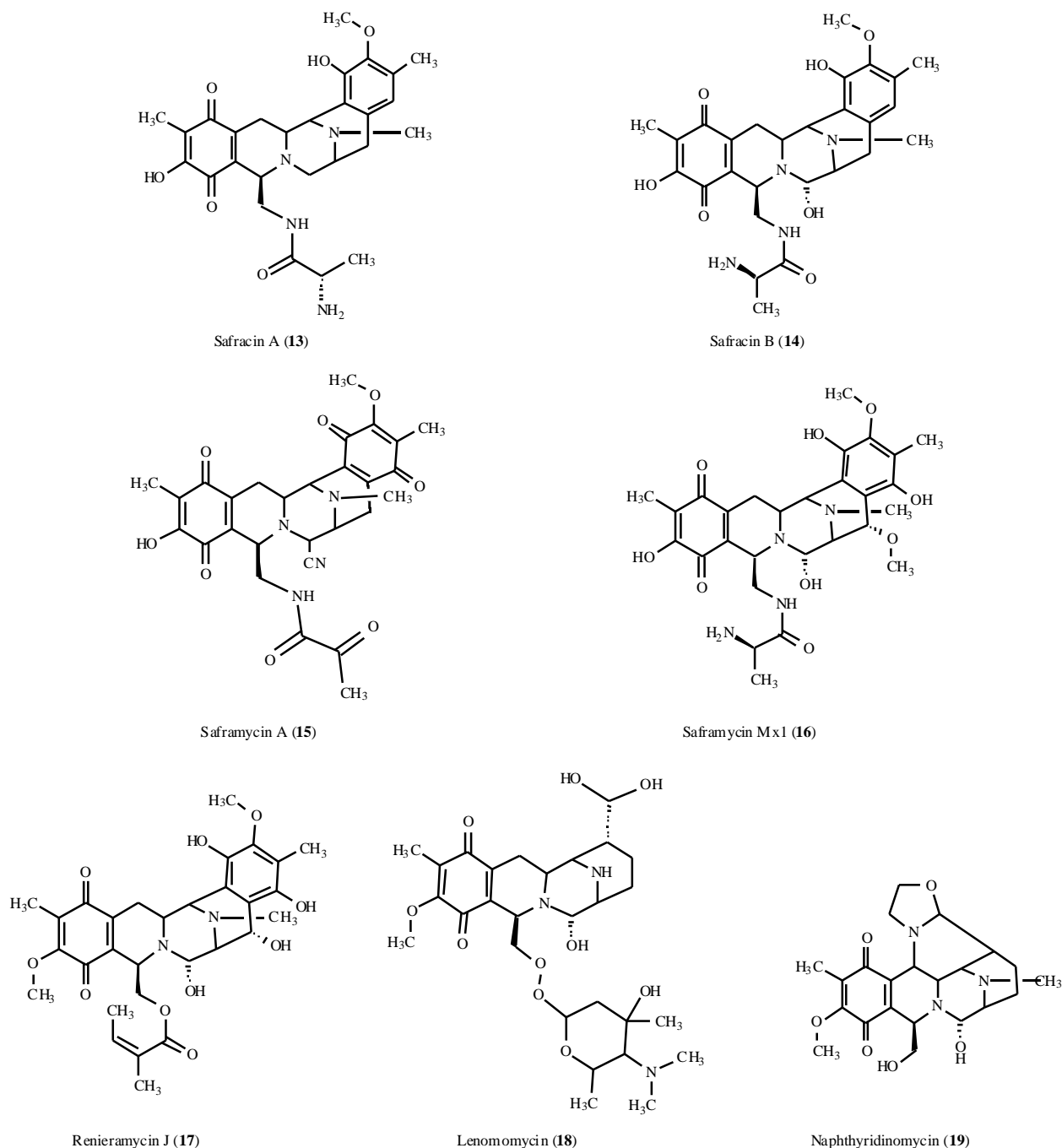
### 3.1. How Does ET-743 (4) Bind to DNA?

The mechanism of action of ET-743 (4) has yet to be fully defined, but DNA appears to be the primary target [76, 81, 82]. Two important observations yield clues about ET's mechanism of action. First, the pattern of potential hydrogen bond acceptors and donors indicates that the drug is likely capable of binding to the minor groove of DNA (Figs. 4A and 4B). Secondly, ETs have a carbinolamine center at the position 2 (Fig. 4C), and elimination of the adjacent hydroxyl group (position 21, Fig. 4C) results in a Schiff base vulnerable to nucleophilic attack, leading to DNA alkylation of amino group of guanine at position 12 [76, 81, 82] (Fig. 4C). The three dimensional structures of the N12-formyl derivative of ET-729 (2) and the natural N12-oxide of ET-743 (4) have been proposed on the basis of X-ray crystallography [64, 68] and the covalent binding interaction between the ETs and DNA double helix has been studied by computer modeling, suggesting that rings A and B 'stack' against the DNA backbone [68].

ET-743 (4) targets DNA by binding in the DNA minor groove in CG-rich sequences by binding in the DNA minor groove in CG-rich sequences [56, 68], with a sequence preference for 5'-RGC-3' (where 'R' stands for any purine) or 5'-YGG-3' (where 'Y' stands for any pyrimidine) [56, 81]. The mechanism of covalent adduct formation involves the reaction of ET-743 (4) with DNA via an iminium intermediate caused by the intramolecular acid-catalyzed dehydration of the carbinolamine functional group (Fig. 4C) [82]. Several classes of minor groove binders have been extensively characterized and clearly, ET-743 (4) produces different biological consequences more than other minor groove alkylating agents. More closely related to ET-743 (4) are other guanine-N2-alkylating agents, which also possess a carbinolamine center, like mitomycin C [83] and benzodiazepines from various strains of *Streptomyces*, including anthramycin [84]. As emphasized before, ET-743 (4) is an alkaloid composed of three fused tetrahydroisoquinoline rings and is structurally related to the DNA-reactive saframycins [85, 86]. The main structural difference between ET-743 (4) and the other



**Fig. (1).** Some examples of ETs molecules isolated from the aqueous ethanolic extracts of *E. turbinata* and *E. thurstoni* (compounds 1 to 10) and from chemical synthesis (gray box, compounds 11 and 12).



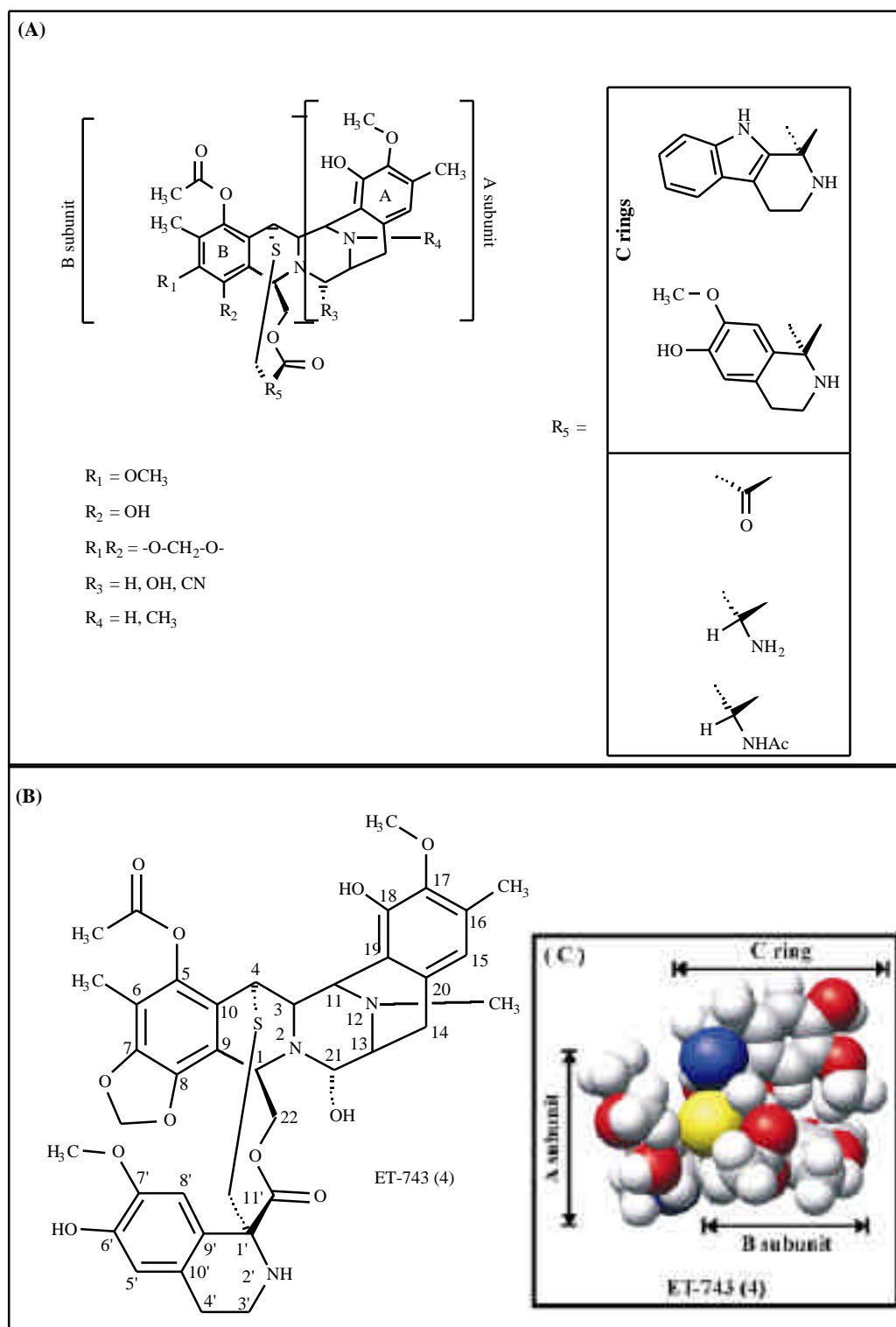
**Fig. (2).** Examples of tetrahydroisoquinoline molecules (compounds **13** to **19**) that show structural similarities with ETs.

tetrahydroisoquinoline compounds, which do not possess antitumoral properties, is an extra ring (C ring, Figs. **1** and **3A**). In this case, the good efficacy of ET-743 (**4**) as an anticancer agent could be attributed to the C ring, while structurally related compounds such as saframycin A (**15**) have lower efficacy [65]. In addition, ET-743 (**4**) can be the first example of a tetrahydroisoquinoline compound that bends DNA toward the major groove (Figs. **4A** and **4B**), and this property may differentiate this compound from other structurally or mechanistically similar drugs [87], which can contribute to the clinical effectiveness of ETs. It should be

pointed out that ET-637 (**11**), which does not possess a C ring, shows a similar ET-743 (**4**) cytotoxic potency and cell cycle perturbation on different human tumor cells [88]. ET-637 (**11**) also induces strongly the apoptotic pathways in leukemia cells [88], a property not seen in ET-743 (**4**).

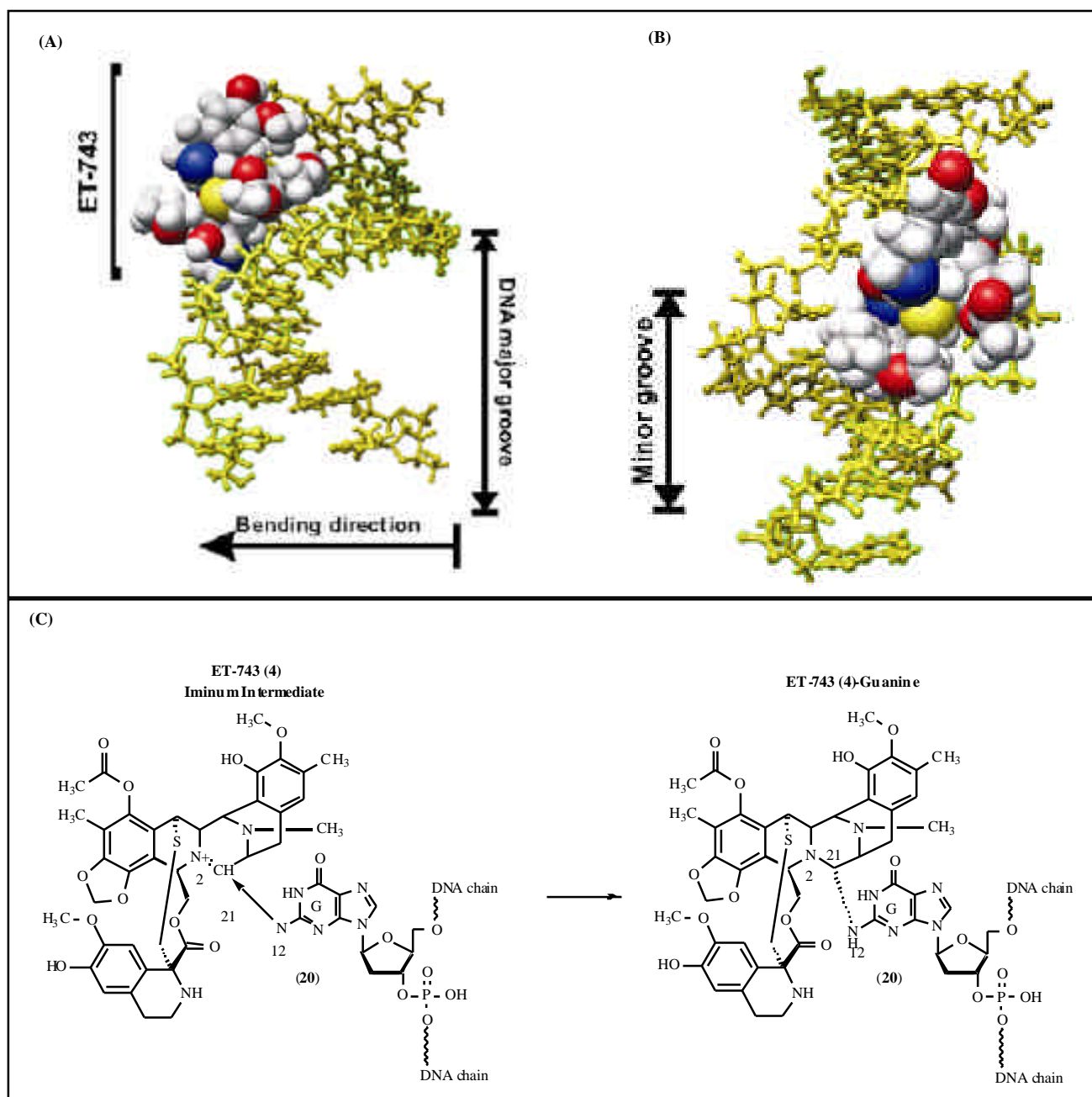
### 3.2. Interference of ET-743 (**4**) in the Molecular and Cellular Processes

Many chemotherapeutic compounds are excreted from the intestine via P-glycoprotein, a broad-specificity efflux pump protein encoded by the multidrug resistance gene *MDR1*



**Fig. (3).** General chemical structure of natural ETs molecules (A). Both A and B subunits of ET are indicated as well as the functional groups that could be found in the positions  $R_1$  to  $R_4$  (A). The functional groups found in position  $R_5$  of natural ET molecules could be a C ring (indicated by a gray box), a ketone, a primary or a secondary amine chains (A). The numerical attribution for each atom that belongs to the ET's backbone chain is shown in (B). In this case, the ET-743 (4) molecule was used as an example. The three-dimensional structure of ET-743 (4) is shown in (C).





**Fig. (4).** Stereoisomer view (A and B) and chemical structure of ET-743 (4) (C) alkylated to **N12** position of guanine (G, 20) in the DNA minor groove from an iminium intermediate. In (A) and (B), the alkylation produces a bend toward the DNA major groove.

[89]. Using a combination of pharmacologic and genetic approaches, Synold *et al.* [90] showed that the orphan nuclear receptor, SXR, activates *MDR1* expression in hepatocytes and intestinal cells and that this activation resulted in enhanced drug efflux. The interaction of ET-743 (4) with *MDR1* is complex. On one hand, the drug is able to inhibit the transcriptional activation of *MDR1* through inhibition of SXR [91]. However, ET-743 (4) is also a substrate for the *MDR1* protein, and prolonged exposure of tumor cells to ET-743 (4) may be accompanied by drug-resistance associated with *MDR1* overexpression [92].

According to the model proposed by Moore *et al.* [81], the C subunit that is not bounded to DNA but projecting out from the minor groove might be able to interfere with DNA-binding factors. With the aim to investigate the mechanisms involved in the transcriptional effects caused by ET-743 (4), D'Incalci *et al.* [93] analysed the ability of ET-743 (4) in to inhibiting transcription factors, like oncogenic products, transcriptional activators regulated during the cell cycle, and general transcription factors, such as Sp1, TATA-binding protein and NF-Y. One of the factors that was preferentially affected by ET-743 (4) was NF-Y [94-96]. Since two subunits of NF-Y have some similarity with histone 2B, the

effect of ET-743 (**4**) on nucleosome reconstitution was investigated, and it was found that a complete inhibition occurred at drug concentrations of 3-10  $\mu$ M [93-97]. These data would suggest that the mode of action correlates with the ability of ET-743 (**4**) to interfere with the binding of regulatory proteins to DNA. However, it is not clear if this is a direct effect of ET-743 (**4**) taking into account that the observed effects happen at concentrations that are much higher than the cytotoxic concentrations that varies between 10 pM to 10 nM [93].

Many clinically useful anticancer agents act by causing DNA damage either directly, by reacting with DNA, or indirectly, by poisoning DNA-processing enzymes, e.g. DNA topoisomerase enzymes. DNA topoisomerases are important targets for chemotherapy of human cancers. Inhibitors of type I (Top1) and II (Top2) topoisomerases are among the most effective anticancer drugs [97]. In general, the drugs convert the enzymes into a cellular poison by stabilizing the topoisomerase cleavage complexes, which are the catalytic intermediates for topoisomerization reactions. These drugs are commonly referred to as 'topoisomerase poisons' [97]. In the case of Top2, the list of inhibitors is extensive and includes DNA intercalators such as doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and epirubicin [98]. For Top1, the only class of inhibitors approved for clinical use are the camptothecin derivatives [99]. Two camptothecin derivatives, irinotecan and topotecan are currently registered for second-line treatment of colorectal and ovarian cancers, respectively [100, 101]. Other compounds, including 9-aminocamptothecin, 9-nitrocamptothecin, GG-211, DX-8951f [102], and BN 80915 [103] have also been clinically evaluated [102], and many other potent camptothecin analogues are in preclinical development [104]. BN 80915 is unusually potent toward human colon carcinoma cells, associated with formation of high levels of stable, covalent DNA topoisomerase complexes [103]. Top1 was identified as a cellular target for ET-743 (**4**) [105]. In cells treated with ET-743 (**4**) the Top1-DNA complexes were detected by using the *in vivo* complex of enzyme (ICE) bioassay. ET-743 (**4**) differs from the camptothecins by the persistence and location of the Top1 cleavage complexes [105]. However, the formation of this complex apparently does not explain the observed cytotoxic effects of ET-743 (**4**) in tumor cells and may possibly be associated with the repair of the drug. An experiment realized with wild type and mutant *TOP1 Saccharomyces cerevisiae* strains indicated that Top1p is not the primary target for ET-743 (**4**) [106]. The PT-650 (**12**) has no Top2p cross-linking ability, but acts in Top1p, inducing cross-linking with DNA [107]. Martinez *et al.* [107] showed that only very high concentrations of PT-650 (**12**) (4 mM) are required for optimum DNA-Top1p cross-linking, which suggest that Top1p activity may be only an auxiliary effect rather than the primary mechanism of action of PT-650 (**12**) and ET-743 (**4**) [107].

Like many other different DNA-interacting drugs, ET-743 (**4**) causes strong perturbation of the cell cycle with a delay of cells progressing from G<sub>1</sub> to G<sub>2</sub>, inhibition of DNA synthesis and a marked blockade in G<sub>2</sub>/M, which does not appear to be p53-dependent [108-112]. What is quite unique with this drug is the much higher sensitivity of G<sub>1</sub> cells. In this sense, microarray data analyses of different cells types

subjected to ET-743 (**4**) treatment have been used to elucidate the mechanism of action of this drug. Gajate *et al.* [112] showed that ET-743 (**4**) rapidly induces cytochrome c release from mitochondria in HL-60 and HeLa cells, activating a mitochondrial-dependent apoptosis pathway. Interestingly, they found that the action of ET-743 (**4**) on cell cycle was transcription-dependent. Carrying out parallel experiments of cell cycle and microarray analyses, Gajate *et al.* [112] found that the expression of 89 genes of the 12,625 genes analysed (0.71%) were altered (20 down-regulated genes and 69 up-regulated genes) when cells were treated under conditions that induced cell cycle arrest (1 ng mL<sup>-1</sup> ET-743 (**4**), 48 h). Interestingly, they also found that ET-743 (**4**) regulated the expression of five cell cycle-related genes that could explain the transcription-dependent effect of ET-743 (**4**) on cell cycle, namely up-regulation of cyclin G<sub>2</sub>, GADD45A and p21 transcripts, and down-regulation of histones and MCM5 [112]. Up- and down-regulation of the above mentioned genes have been reported to induce an increase in S phase and a G<sub>2</sub>/M arrest in different systems [113-118] consistent with the same effects observed for ET-743-treated cells.

On the other hand, Martínez *et al.* [119] analysed the expression of 6,700 cancer-related genes using a cDNA microarray, including those related to cell cycle and apoptosis, in STS cell lines explanted from chemo-naïve patients with different patterns of sensitivity to ET-743 (**4**). The gene expression profile analysis revealed up-regulation of 86 genes and down-regulation of 244 genes in response to ET-743 (**4**), with massive down-regulation of gene transcription in the majority of the cell lines. High-throughput screening has allowed the identification of genes that are induced after treatment with ET-743 (**4**), including *CS-1*, *ATF3*, *SAT*, *JUNB*, *GADD45*, and *ID2*. These genes have a common role as transcription regulators, leading to cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M and apoptosis [119], which can be correlated with the cell cycle arrest and apoptosis induced after treatment of different cell types with ET-743 (**4**) [113-118]. Interestingly, the authors also identified an up-regulation of: (i) *RAD17* and *BRCA1*, two DNA-damage sensor proteins; (ii) the apoptosis inducer proteins, *PAR4* and *CASP8AP2*; and (iii) the p53 targets, *TP53DINP1* and *CDKN1A* [119].

An inhibitory effect of ET-743 (**4**) in cells deficient for telomeric maintenance was reported by Biroccio *et al.* [120]. These authors studied the ET-induced cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M phase using, as the experimental model, human melanoma clones that show reduced human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression and telomerase activity, characterized by telomere dysfunction. The data indicated that the reconstitution of telomerase activity by exogenous hTERT expression improved telomere function and reduced the cellular sensitivity to ET-743 (**4**) [120]. Moreover, they demonstrated that the permanence in G<sub>2</sub>/M phase of ET-743-treated cells without hTERT reconstitution led the cells to activate the apoptotic program and that telomere dysfunction is involved in the susceptibility to ET-743 (**4**) in melanoma cells [120].

A recent work published by Allavena *et al.* [121] showed that ET-743 (**4**) has a selective cytotoxic effect on monocytes

and macrophages including tumor-associated macrophages (TAMs). A growing body of evidence indicates that TAMs are skewed toward M2 macrophages (a subset of macrophages with low cytotoxic functions but high tissue-remodeling activity) and produce a variety of growth and angiogenic factors as well as immunosuppressive molecules [121]. In this case, the presence of TAMs at the tumor site and the continuous expression of their products may favor, rather than antagonize, tumor progression [121]. It was showed that, at sub-cytotoxic concentrations, ET-743 (4) significantly reduced the production of two pro-inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), which have a major role in host-tumor relationship and in cancer progression [121]. Interestingly, short-term exposures to ET-743 (4) inhibit the differentiation of macrophages *in vitro*. Considering the tumor promoting role of TAM and the increasing link between inflammation and cancer, the high anti-inflammatory activity properties of ET-743 (4) may also contribute to its antitumor activity [121].

### 3.3. Interference of ET-743 (4) with DNA Repair Mechanisms

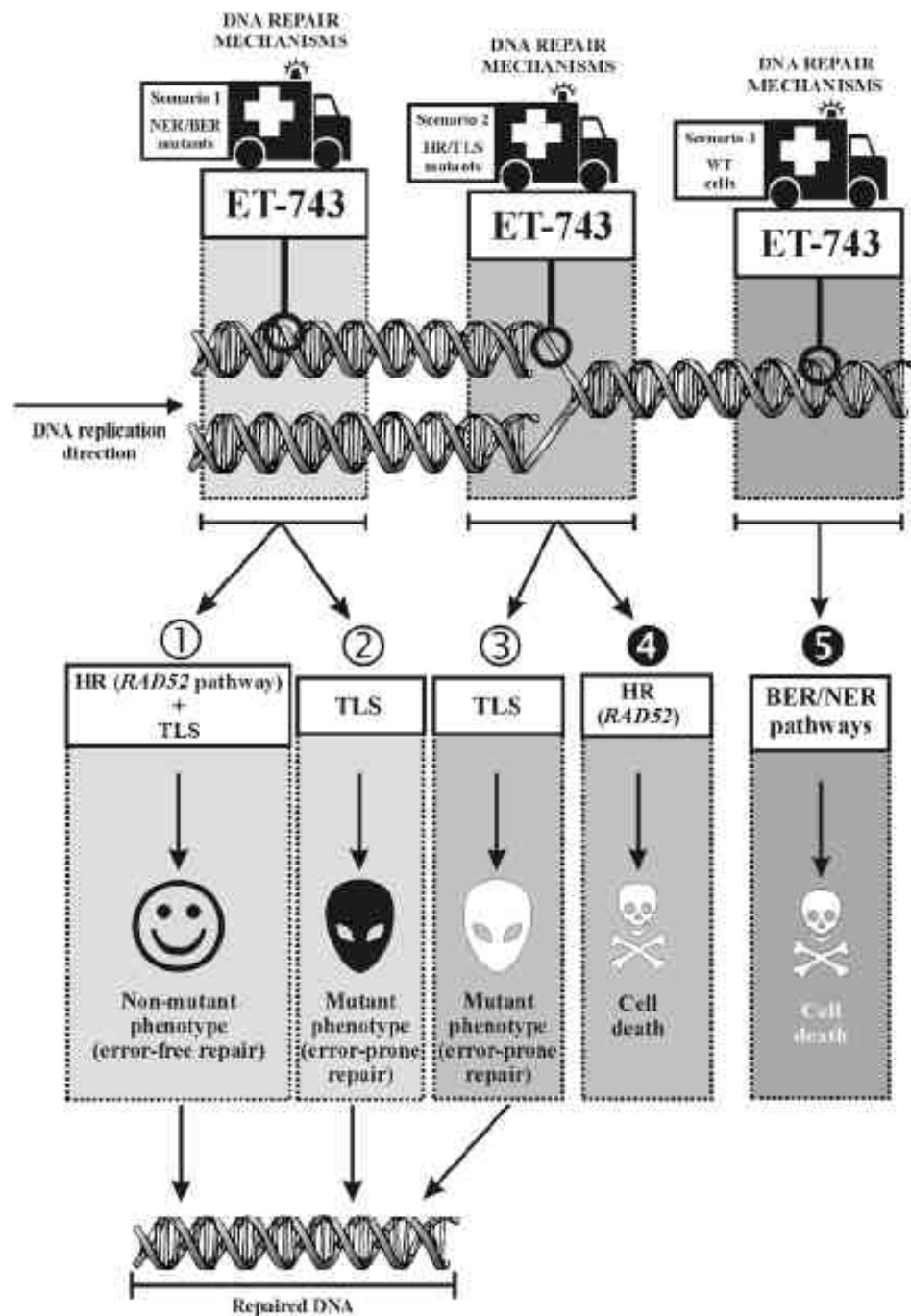
As ET-743 (4) has the ability to induce DNA damage by alkylating the amino group of guanine, one should consider the possible roles of different DNA repair mechanisms on the tolerance or elimination of ET-743-lesions on DNA molecule. One proposed mechanism of action of DNA repair pathways involves ET-743 (4) interaction with the transcription-coupled (TC) NER machinery [122]. TC-NER acts on the removal of lesions that distort the DNA double helix, interfere in base pairing, and block DNA duplication and transcription [122]. Incision of damaged DNA in both yeast and humans by TC-NER utilizes the function of two endonucleases: Rad1p-Rad10p and Rad2p in yeast, and XPF-ERCC1 and XPG in humans [123, 124]. Xeroderma pigmentosum cells deficient in the NER genes *XPG*, *XPA*, *XPD* or *XPF* were resistant to ET-743 (4), and sensitivity was restored by complementation with wild-type genes [122]. Moreover, studies of cells deficient in *XPC* or in the genes implicated in Cockayne syndrome (*CSA* and *CSB*) indicated that the ET-743 (4) sensitivity is specifically dependent on the transcription-coupled pathway of NER [122]. Most other drugs, which cause DNA alkylation, were observed to behave in the opposite way (i.e. increased sensitivity of NER-deficient cells) [72, 125]. This finding is somehow analogous to that of the resistance to cisplatin in mismatch-repair-deficient cells, where the removal of the lethal cisplatin-DNA damage is counterproductive because it activates a cascade of signals leading the cell to death [126, 127].

Considering the implications of the involvement of NER pathway in mediating the biological potency, and perhaps specificity, of ET-743 (4), Zewail-Foote *et al.* [74] studied the recognition and incision of ET-743-DNA adducts by UvrABC nuclease complex in the model bacterium *Escherichia coli*. The UvrABC nuclease complex mediated the NER pathway in prokaryotes and showed functional analogy with the TC-NER in eukaryotes. The authors showed that not all ET-743-DNA adducts are equally incised by the UvrABC nuclease complex, and that ET-743-adducts

at the nonpreferred sequences were incised with the highest efficiency compared to adducts at the preferred sequences [74]. These authors proposed that the adducts, when not efficiently repaired, trap DNA-nucleotide excision repair proteins forming cytotoxic complexes, which results in cell death [74]. Moreover, the authors observed that in the absence of an intact UvrABC nuclease complex, the toxic lesion is unable to form, and the ET-743-DNA adducts, although not repaired by the NER pathway, are less toxic to cells [74].

Taking these results in mind, our research group analysed the cytotoxicity and tolerance to ET-743 (4) in the yeast *S. cerevisiae*, defective for NER and/or base excision repair (BER), either in single mutants or in combination with mutant alleles of genes encoding proteins involved in DNA translesion synthesis (TLS) and homologous recombination (HR) [75]. Also, we studied the possibility of ET-743 (4) in inducing mutagenesis and mitotic recombination (crossing-over and gene conversion) on yeast cells [75]. The results indicated that BER enzymes, like Apn1p (an apurinic/aprimidinic endonuclease), together with Rad1p-Rad10p and Rad2p, recognize and act in the DNA damage induced by ET-743 (4) [75]. As expected, the WT cells show a high sensitivity to different ET-743 (4) treatments, while single mutants for NER and BER endonuclease enzymes were resistant [75]. Also, the induction of mutagenesis and mitotic recombination in yeast cells by ET-743 (4) indicate the participation of HR and TLS in damage tolerance, a fact that was corroborated by the analysis of yeast HR and TLS mutants. These data allowed us to draw a model of ET-743 (4) cytotoxicity in WT and mutant cells for DNA repair pathways (Fig. 5). In the yeast cells lacking the endonucleolytic components of BER and NER repair, the processing of ET-743 (4) induced DNA-damage could be mediated by two DNA repair pathways (Fig. 5): (1) HR associated with TLS (error-free) or (2) a second TLS, leading to mutant and WT phenotypes (error-prone). In contrast, our model proposes that the repair of a stalled replication fork by NER/BER and HR proteins, in the presence of an ET-743-adduct, probably results in toxic recombinational products that lead to cell death when an error-prone TLS pathway is not functional (Fig. 5). Moreover, the absence of a HR protein (e.g. Rad52p) channels the repair of stalled replication forks to a TLS pathway, resulting in cell survival and ET-743 (4) tolerance (Fig. 5). In *S. cerevisiae* WT cells the NER/BER repair systems recognize the DNA damage after treatment with ET-743 (4), inducing the recruitment of specific endonucleases (e.g. Apn1p, Rad1p-Rad10p, and Rad2p) (Fig. 5). These complexes are trapped by the C subunit of ET-743 (4), and thus form a covalently attached complex with DNA, stalling the DNA polymerase [75].

Other DNA repair mechanisms associated with the cell's sensitivity to ET-743 (4) relies on the action of proteins like DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). ET-743 (4) was found to be about fivefold more active in cells lacking DNA-PKcs, and treatment with wortmannin, a potent inhibitor of DNA-PKcs sensitized the cells to ET-743 (4) [106]. It was showed that the loss of PARP-1 causes increased sensitivity (~30 fold) to ET-743 (4) when



**Fig. (5).** Model proposed for ET-743 cytotoxicity in WT and DNA repair defective mutants. In mutant strains lacking BER and NER endonucleases (Scenario 1), ET-743 (4) damage can be tolerated by translesion synthesis (TLS) mediated by DNA polymerase  $\zeta$  (Rev3p) and  $\eta$  (Rad30p). In this case, mispairing or abasic sites originating from DNA replication opposite of the ET-743 adduct can be channeled to (1) homologous recombination associated with TLS (error-free pathway) in the absence of Rev3p, generating a non-mutant phenotype (smile face) or (2) DNA translesion synthesis (error-prone pathway), when Rad52p is not present and thus generating a mutant phenotype (alien face). In yeast strains defectives for HR or TLS but proficient for NER/BER pathways (Scenario 2), an ET-743-stalled DNA replication fork could be tentatively repaired by (3) TLS in the absence of HR (Rad52p), resulting in cell survival and a mutant phenotype (alien face), or (4) by HR when a TLS pathway (Rev3p) is not fully functional. In this last case, the recombinational products resulting from the action of NER/BER endonucleases plus HR proteins together with ET-743 (4) are extremely genotoxic for the cell, resulting in cell death (bone-and-skull representation). In WT cells, which have functional NER and BER endonuclease activities (Scenario 3), ET-743 (4) could binds covalently to the endonuclease proteins. This complex represents a permanently bound structure that stalls the DNA polymerase complex, thus inducing cell cycle arrest or even cell death (bone-and-skull representation).

compared to cells containing a fully functional PARP-1 protein [128]. In this case, the authors speculated that the complex DNA-ET-743 (4) promotes the catalytic activation of PARP-1, resulting in the ribosylation and inactivation of cellular proteins involved in transcription [128]. On the other hand, it could be speculated that the absence of PARP-1 and DNA-PKcs lead to an inactivation of non-homologous end joining (NHEJ) pathway, allowing the action of HR which generate cytotoxic ET-743 (4) intermediates [75]. It was proposed that PARP-1 acts in an end-joining activity independent of the DNA-PK/XRCC4-ligase IV complex but that actually required a novel synopsis activity of PARP-1 and the ligation activity of the XRCC1-DNA ligase III complex, proteins otherwise involved in the BER pathway [129]. It was suggested that a PARP-1-dependent DNA double-strand breaks (DSBs) end-joining activity may exist in mammalian cells, and this mechanism could act as an alternative route for DSBs repair of multiple substrates generated by genotoxic agents or stalled replication forks, complementing the DNA-PK/XRCC4/ligase IV-dependent NHEJ pathway [129].

### 3.4. Combination of ET-743 (4) with other Antitumoral Drugs and Radiation

A logical consequence that arose from the studies of ET-743 (4) action mechanisms was the analysis of its combinations with other antitumor compounds. Preclinical data has indicated a synergy between ET-743 (4) and anthracyclines, taxanes, and cisplatin [130]. Interestingly, the preclinical data also indicated that relatively non-toxic doses of ET-743 (4) could increase the action of other antitumoral drugs, as observed for cisplatin [93, 119]. This finding means that ET-743 (4) may be used at lower, relatively nontoxic, doses to potentiate the antitumor activity of cisplatin [93]. Ongoing *in vivo* studies in xenografts appear to confirm that cisplatin efficacy can be increased dramatically by the concomitant use of ET-743 (4), even at doses that alone produce no apparent effect [93]. Sequence-dependent synergies have also been observed when combining ET-743 (4) with doxorubicin or with paclitaxel in STS cell lines [131]. The most favorable effects were seen by treating the cells with ET-743 (4) first followed by doxorubicin, and by exposing the cells to paclitaxel followed by ET-743 (4) [93]. It also should be noted that the use of antitumoral drugs that target some DNA repair proteins (e.g. Top1, PARP-1 and DNA-PKcs) in combination with ET-743 (4) is an interesting option, taking into account the recent data about the mechanism of action of ET-743 (4) together with DNA repair mechanisms.

Simoens *et al.* [132] investigated the interaction between ET-743 (4) and radiation on the cell cycle of four tumor cell lines *in vitro*. The results showed that ET-743 (4) has moderate cell line-dependent radiosensitising properties, possibly due to the induction of G<sub>2</sub>/M arrest. However, these radiosensitising properties only could be achieved when high concentrations of ET-743 (4) were used [132].

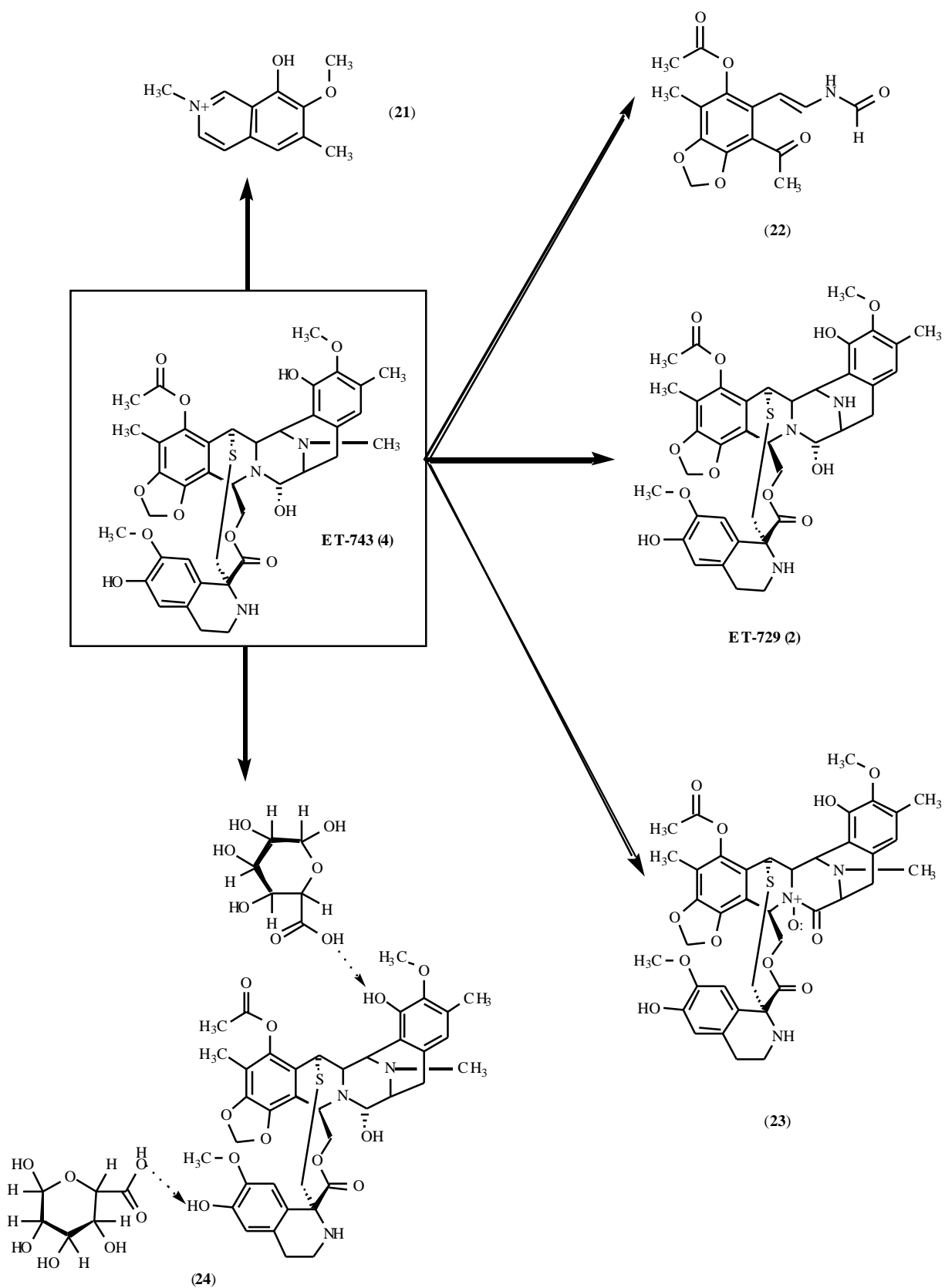
### 3.5. ET-743 (4) Metabolism in Human Cells

The effectiveness of many pharmacological agents is limited by metabolic inactivation and excretion. A variety of clinically significant drugs including paclitaxel, verapamil,

ibuprofen, thiazolidinediones, benzodiazepines and others are subjected to metabolic inactivation by the hepatic cytochrome P-450 enzymes (CYPs) [133]. In the case of ET-743 (4), the metabolic data about this compound are very limited. Studies of microsomal preparations containing cDNA expressed rat CYPs suggest that CYP2 isoforms, specially CYP3A4, may contribute to the NADPH-dependent ET-743 (4) metabolism detected in rat liver microsomal preparations [133]. In humans, both CYP3A4 and CYP2C9 isoforms likely contributed moderately to ET-743 (4) metabolism based on a correlation with tolbutamide methyl-hydroxylation and inhibition by  $\alpha$ -naphthoflavone and quercetin [133, 134]. Other CYP isoforms, e.g. CYP2E1 and CYP2D6, probably have a minor role in ET-743 (4) metabolism, based on the absence of a correlation with chlorzoxazone 6-hydroxylation and dextromethorphan *O*-demethylation, as well as absence of inhibition by quinidine and chlorzoxazone [133]. A recent study performed by Sparidans *et al.* [134] based on a four-step approach biochemical analysis, followed by the work of Reid *et al.* [133], identified the rat and human metabolites of ET-743 (4). Both studies identified three major metabolites in liver microsomal preparations after incubation with ET-743 (4) (Fig. 6 and compounds 21 to 23). Interestingly, a glucuronidation product of ET-743 (4) (Fig. 6 and compound 24) was identified using laser capture-mass spectrometry analyses (LC-MS) [136]. On the other hand, Reid *et al.* [133] detected ET-729 (2) as a metabolite of ET-743 (4) by HPLC/MS analysis after drug incubation with microsomal preparations containing only the CYP3A4 isoform. As noted by the authors, the absence of ET-729 (2) in rat and human liver microsomal preparations may be the result of subsequent metabolism by other CYPs that are not found in microsomal preparations containing only the individual isoforms [133]. The presence of ET-729 (2) as a metabolite of ET-743 (4) suggests that this compound may be responsible for the transient hepatotoxicity seen in early clinical trials of ET-743 (4) [133]. Interestingly, ET-729 (2) was the first of this potent series of molecules to complete the preclinical investigations [135], but unacceptable toxicity in rodents and dogs [136] and limited availability of this agent led to investigation of ET-743 (4). These studies also open the possibility to analyse the structure-function relationship between different ET structures and their mechanism of action. Different ET molecules are probably metabolized by different CYP isoforms, resulting in metabolites with distinct pharmacological properties in both normal and tumoral cells.

## 4. CURRENT CLINICAL STATUS OF ET-743 (4)

Following extensive preclinical studies, ET-743 (4) phase I clinical trials were initiated to determine the maximum tolerated dose in humans [130]. Thus, phase I clinical trials started back in 1996 and phase II and comparative trials are currently in progress [11]. The data available thus far confirm a therapeutic potential in patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes and in women with ovarian cancer that is resistant, or has experienced relapse, to platin-taxane-based therapy [69, 137, 138]. Additionally, a large phase II program, conducted on patients with advanced STS that is resistant, or has undergone relapse, to conventional agents, has shown long-



**Fig. (6).** Potential metabolites of ET-743 (4) (compounds 21 to 23), including ET-729 (2) as well as the glucuronidated (24) product of ET-743 (4). The possible sites of glucuronic acid (24) conjugation with ET-743 (4) molecule are indicated by the dashed arrow.

lasting objective responses and tumor control in a clinically significant proportion of cases [2, 139, 140]. Treatment with ET-743 (**4**) seems to have an effect on both median survival and on the proportion of patients (29%) who were alive after 2 or more years [119]. This clinical data set suggests major constitutive/molecular differences between a group of patients in whom the compound is able to modulate progression of the disease for very long periods and a cohort that is fully resistant to ET-743 (**4**) [119]. Reported side effects were transaminitis, neutropenia, febrile neutropenia, thrombocytopenia, fatigue, nausea, and vomiting [130]. Dose-dependent hepatotoxicity was a common side effect in preclinical studies and early-phase clinical trials. In this case, the administration of dexamethasone was useful in increasing drug clearance by 27% and in reducing the risks of hepatotoxicity [130]. Pretreatment with  $\alpha$ -naphthoflavone and phenobarbitone ameliorated ET-743-mediated hepatotoxicity *in vivo* [141]. Another agent, *N*-acetylcysteine, failed to protect rat livers against ET-743 (**4**) cytotoxicity [141]. Donald *et al.* [141] tested the hypothesis that indole-3-carbinol (I3C), the hydrolysis product of glucosinolates occurring in cruciferous vegetables, may protect against ET-743-induced hepatotoxicity in the female Wistar rat, the animal species with the highest sensitivity toward the adverse hepatic effect of this drug. Addition of I3C to the diet (0.5%) for 6 days prior to ET-743 (**4**) administration almost completely abolished the manifestations of hepatotoxicity but did not interfere with the antitumor efficacy of ET-743 (**4**). These results suggest that ingestion of I3C may counteract the unwanted effects of ET-743 (**4**) in the liver [141].

ET-743 (**4**) was introduced into human clinical trials while these mechanisms were being worked out, and by 2002 it had been administered to over 1000 patients in phase I and phase II trials [142] covering a variety of cancers. Currently, ET-743 (**4**) is undergoing phase III clinical trials for ovarian, endometrial, breast, prostate, non-small cell lung and pediatric sarcomas [143]. The results from the European phase I and pharmacokinetic trials were reported by Twelves *et al.* [144] and details of the human pharmacokinetics and activities against bone tumor cells *in vitro* were also published recently [145]. In 2001, ET-743 (**4**) was licensed to PharmaMar in partnership with Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development under the brand name Yondelis<sup>TM</sup>, with the generic name of Trabectedin<sup>TM</sup>. Two full reports on the phase II trials have been published [146, 147] giving details of toxicities and response levels in sarcomas and other carcinomas with both pretreated and naive patients. Preliminary results from a combination study of ET-743 (**4**) and doxorubicin indicated a partial remission in untreated sarcoma and non-anthracycline-treated breast cancer patients [148]. Interestingly, the same effect was observed in a phase I study [149] with a combined use of paclitaxel and ET-743 (**4**).

As a result of these earlier trials, ET-743 (**4**) was pre-registered in the European Union (EU) and granted orphan drug status for STSs by the European Commission's Committee for Orphan Medicinal Products (COMP) of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) [142]. However, in late July 2003, the EU's Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP)

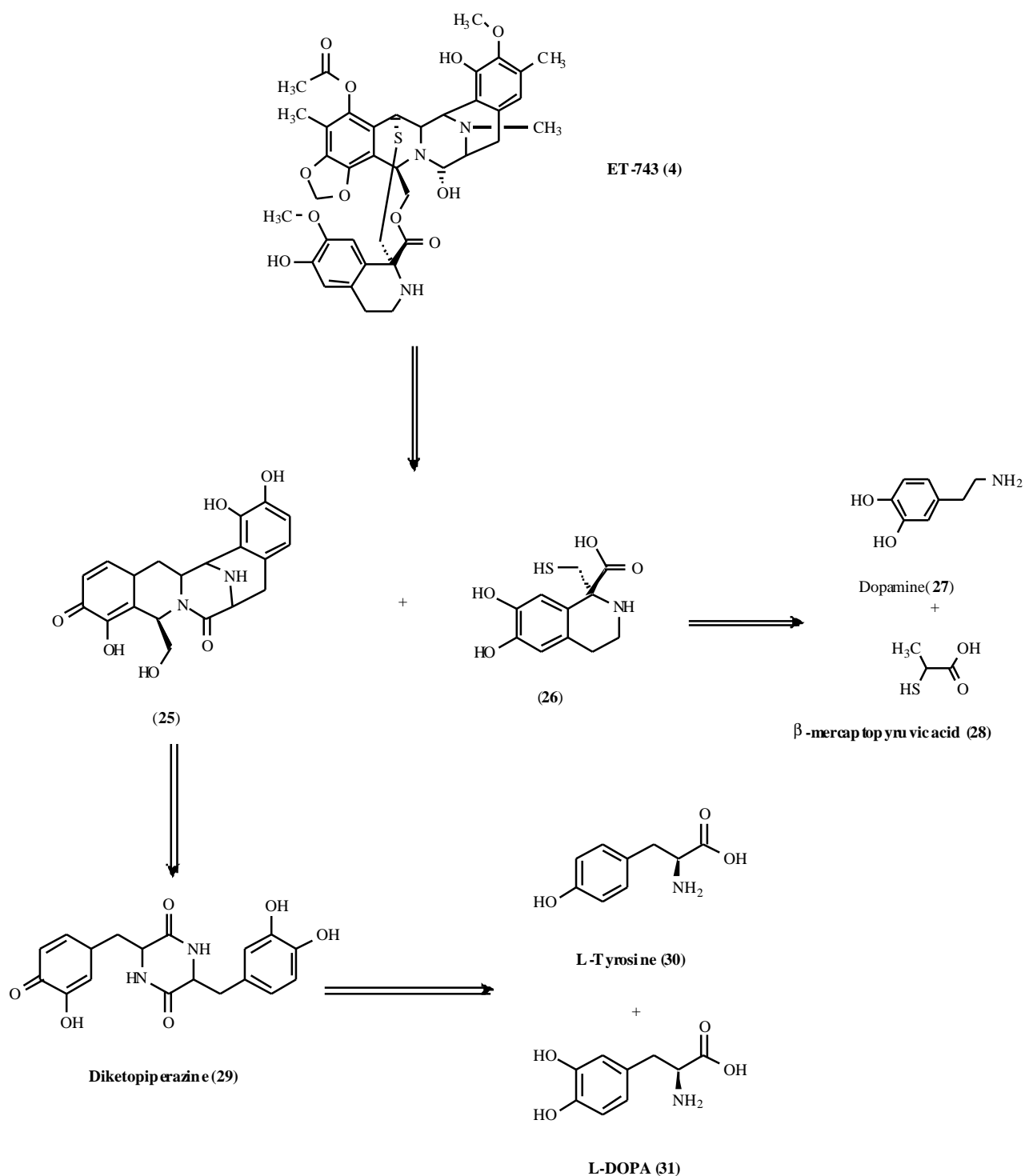
recommended, on a majority vote, that marketing authorization for advanced STSs should not be granted for the EU. This decision was appealed in September 2003 by PharmaMar [142], but in December 2003 the appeal was denied [142]. However, the compound was granted orphan drug status for ovarian cancer by the CPMP during the appeal process on STSs referred above [142]. In 2005, ET-743 (**4**) was also granted orphan drug by the U. S. Food and Drugs Administration (FDA) [143].

## 5. (BIO)CHEMICAL SYNTHESIS OF ETS: DESIGN AND PRODUCTION

### 5.1. Possible Biochemical Pathways for ET Synthesis

As suggested by Rinehart *et al.* [55], examination of the structures of these alkaloids seems to indicate that the ET skeleton is synthesized biologically from a functional diketopiperazine (**25**) and compound (**26**) (Fig. 7). Compound (**25**) is likely derived from diketopiperazine (**29**), which is either a condensation product of two molecules of DOPA (**31**) or the result of hydroxylation of the diketopiperazine (**29**) from L-tyrosine (**30**) [55]. Compound (**26**) appears to be derived from the condensation of dopamine (**27**) with  $\beta$ -mercaptopyruvic acid (**28**). It is also conceivable that compound (**25**) could condense with  $\beta$ -mercaptopyruvic acid (**28**) and this subsequently combines with dopamine (**27**) [55]. These analyses were further corroborated by Kerr and Miranda [150], which showed that <sup>14</sup>C-labeled L-tyrosine and <sup>35</sup>S-labeled L-cysteine were incorporated into ET-743 (**4**) in a cell-free extract from *E. turbinata*. Using the same cell-free extract and three radiolabeled diketopiperazines derivatives, Jeedigunta *et al.* [151] found that the L-tyrosine-containing diketopiperazine and the DOPA-containing diketopiperazine were incorporated into ET-743 (**4**). It should be noted that, despite the pioneer work above cited, the biosynthetic route of ET in *E. turbinata* remains largely unknown.

A close inspection of the structural features of ET-743 (**4**) reveals striking similarities to safracin B (**14**). This chemical similarity is in fact so pronounced that biotechnologically available cyanosafracin B (**43**) provides a commercially feasible precursor for a partial synthesis of ET-743 (**4**) [152]. So, it is possible that ETs could be also synthesized by bacterial species that inhabit the tissues of *E. turbinata* in a symbiotic or an epibiotic manner rather than reflecting a mere chemical coincidence. As mentioned before, ascidians are a rich source of different bacterial species, many of them uncultivable. Hirose and Saito [153] detected corkscrew-shaped motile bacteria in the tunic matrix of the tropical *Botrylloides simodensis*. Hirose *et al.* [154] also described bacteria of identical morphology from the tunic of the bioluminescent *Clavelina miniata*. In the colonial ascidian, *Lissoclinum punctata*, Hirose *et al.* [155] observed the symbiotic photosynthetic *Prochloron* sp. inside and outside the tunic, and Mackie and Singla [156] detected bacteria in the tunic of *Diplosoma listerianum* and *D. macdonaldi*. For the benthic, colonial ascidian *Diplosoma migrans* of the North Sea, Groepler and Kümmel [157] observed for the first time intratunical bacteria. In *E. turbinata* Moss *et al.* [42] could identify, using a combination of 16S rRNA gene analysis, *in situ* hybridization and electron microscopy, three novel bacterial



**Fig. (7).** Chemical study of the putative biosynthetic molecules precursors (compounds **25** to **31**) that could rise to ET-743 (**4**). For an additional explanation and analysis of possible biosynthetic routes used for ET synthesis, please refer to the main text of this review.

strains. One of these three new bacterial strains was denominated “*Candidatus* Endoecteinascidia frumentensis”, which falls into the  $\gamma$ -proteobacteria subdivision and shows similarities to species in the *Legionella* and *Oceanospirillum* subgroups. Interestingly, many previously described marine endosymbionts belong to the  $\gamma$ -proteobacteria subdivision,

with representatives from sponges [158], bivalves [159], oligochaetes [160] and bryozoans [161], covering a range of ecological niches and putative activities. The other two bacterial strains were identified as “*Spiroplasma*-like” genera [42]. *In situ* hybridization using universal and specific probes suggested that these bacteria were located within host



cells in adult and larval tissues. It appears that these bacteria are free, possibly in the blood in zooids, and present at higher densities in the embryos and larvae [42]. In embryos they are present in large cells throughout the developing tissue and in larvae, clustered in the pharynx and body sinuses in bacterial capsules (Fig. 8A).

Again, considering that these bacterial symbionts could be responsible for ET production in *E. turbinata* tissues, one possibility to study the presence of biosynthetic ET genes and metabolites intermediates is combining metagenomic and chemical analyses (Fig. 8B). In this case, tissues from *E. turbinata* are homogenized and the bacterial cells or capsules separated by Percoll® or sucrose gradient (Fig. 8B). From the purified bacterial cells, metagenomic and chemical analyses are performed in order to identify the biosynthetic pathways that can give rise to ET (Fig. 8B).

Recently it was elucidated the biosynthetic pathway of safracin A (13) and B (14) in the  $\gamma$ -proteobacterium *Pseudomonas fluorescens* A2-2 [162]. The similarities observed between the structures of safracin and the saframycin Mx1 (16), an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus* [163], suggested that safracin is likely to be synthesized by a similar non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) mechanism. Using degenerated oligonucleotides, Velasco *et al.* [162] cloned a genomic fragment of 17.5 kb that contains 10 ORFs organized in two putative divergent operons (denominated *sacABCDEFGHIJ* and *sacIJ*, respectively). The expression of this genomic fragment in other *Pseudomonas* species that naturally do not produce safracin allowed these bacteria to produce high amounts of both safracin A and B, indicating that this fragment contains the complete safracin biosynthetic operon [162]. Comparative analyses suggested that the *sacABCDEFGHIJ* operon is responsible for the safracin skeleton whereas the *sacIJ* operon is responsible for the final tailoring of safracins. The biochemical pathway for safracin synthesis is shown in Fig. (9) and, basically, a L-tyrosine (30) molecule is converted to the precursors 3-methyl-*O*-methyltyrosine (32) and 3-hydroxy-5-methyl-*O*-methyltyrosine (33) by the proteins SacF (a methyltransferase), SacG (an *O*-methyltransferase) and SacD (function unknown) (Fig. 9). Two molecules of this 3-hydroxy-5-methyl-*O*-methyltyrosine (33) precursor, together with L-alanine (34) and glycine (35), are selected and loaded on specific NRPS modules to form the safracin tetrapeptide basic skeleton (Fig. 9 and compound 37). The NRPS modules are presented in the proteins SacA, SacB and SacC. Probably, before the tetrapeptide cyclization (Fig. 9), one molecule of 3-hydroxy-5-methyl-*O*-methyltyrosine (33) is hydroxylated and the other is *N*-methylated by the tailoring enzymes of the safracin pathway, SacI (ubiquinone/menaquinone methyltransferase) and SacJ (monooxygenases/hydroxylase). Finally, the tetrapeptide could be released and cyclized by the activity of the putative reductase domain of SacC, generating one molecule of safracin B (14) that is further converted to safracin A (13) by the enzyme SacH (function unknown). As noted by Velasco *et al.* [162], the expression of the operon *sacABCDEFGHIJ* and *sacIJ* could be used to produce molecules for the hemisynthesis of ETs (Fig. 9), but it also opens the possibility to study how bacterial safracins are converted in ET molecules *in vivo* in *E. turbinata* tissues.

## 5.2. Marine Pharmaceutical Aquaculture for ET Production

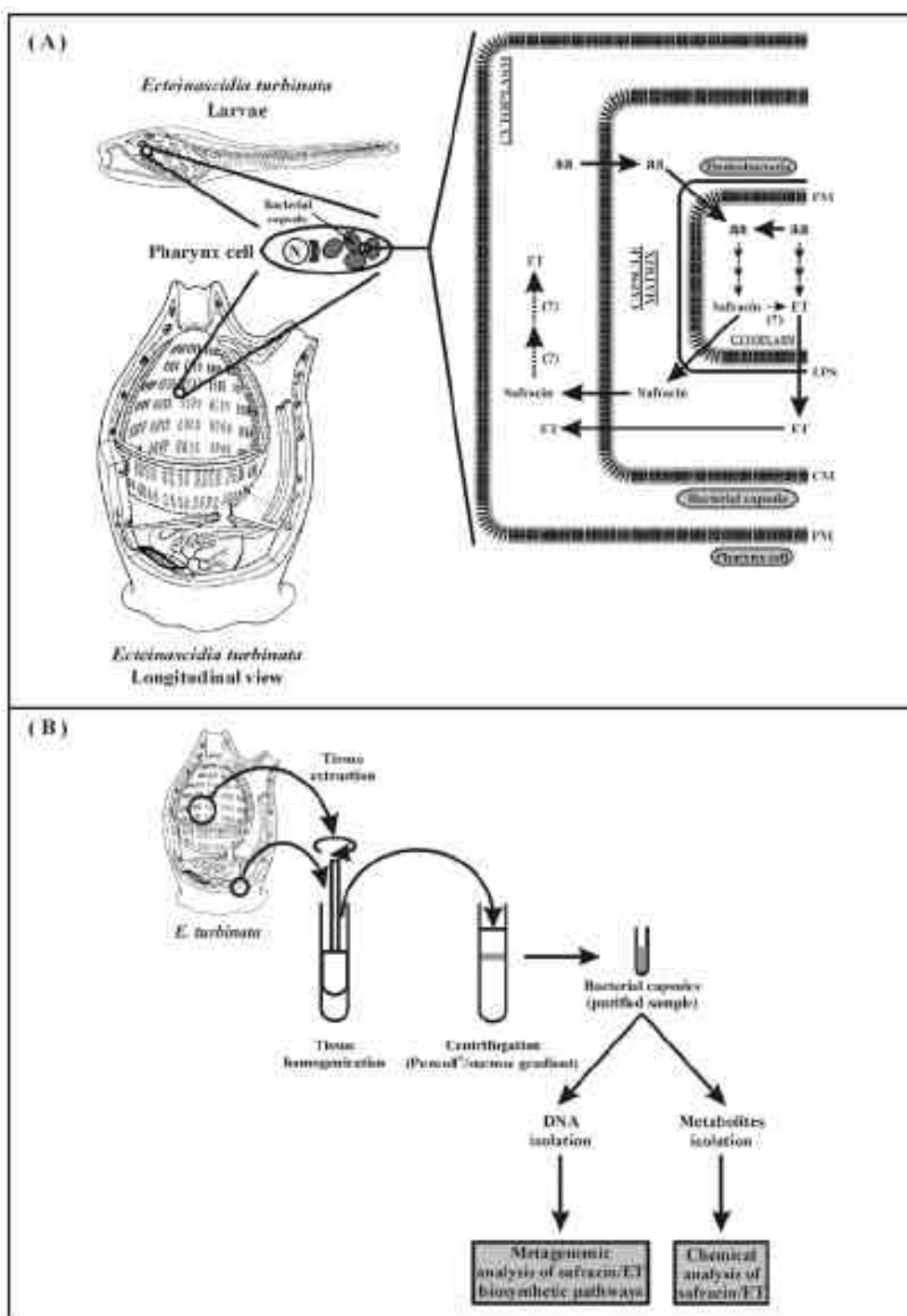
Given the fact that ETs are secondary metabolites found in *E. turbinata* tissues, natural production yields are commonly in the 0.01 ppm range on a wet-weight basis, and sometimes even lower titers are found. At these levels, it can take literally kilo-tonnes of freshly-harvested biomass material laboriously handled and then extracted and purified in relatively small batches to produce sufficient quantities of ET-743 (4) to support a successful pre-clinical and early clinical development program [14]. In addition to inherent low natural product yields, many other technical and logistical problems beset the marine natural product researcher. With the obvious environmental consequences of large-scale natural collections of these often rare and sparsely distributed marine organisms, alternatives for guaranteeing a reliable, renewable and cost-effective source of supply seem to be necessary for a commercial ET-743 (4) production [14]. An economically, feasible solution for ET production is based on the use of aquaculture methods or "aquapharm" to cultivate *E. turbinata* in commercial scale. Mendola [14] reported a successful aquaculture experiment with *E. turbinata*, with a biomass production averaged of 400 g of *E. turbinata* by meter of polyethylene rope with a range of 200 to 1,200 g of *E. turbinata* biomass attained in 45 to 90 days under the sea [14]. The average crop cycle period was 60 days, yielding biomass productivity per rope per year of 1,200 g wet weight [14]. Using this data, it was also possible to extrapolate a production of 16-138 g of ET-729 (2) and ET-743 (4) per year [14], an amount of drug sufficient to supply the market and to lower considerably the price of the drug [14].

## 5.3. Chemical Synthesis of ETs

While biosynthetic production of ETs is still unavailable and aquaculture processes for *E. turbinata* cultivation rest on experimental stage, the chemical synthesis of ETs and its derivatives is the leader process used by the pharmaceutical industry. Also, the procedures of combinatorial chemistry associated with new and efficient industrial processes have allowed the development of ET-analogues with properties not found in natural ET molecules, as is the case of PT-650 (12) and saframycin A-derivatives, obtained from different synthetic routes.

To date there are three chemical protocols for the total syntheses of ET-743 (4) and its analogues. The first total synthesis of ET-743 (4) was published by Corey *et al.* [164], and was followed by the work of Cuevas *et al.* [152], which used a semisynthetic route involving the conversion of cyanosafracin B (43) to ET-743 (4). Additionally, Endo *et al.* [165] reported the total synthesis of ET-743 (4) using a four-component condensation reaction of a diketopiperazine (52) component. Recently, a fourth method was reported by Myers and Lanman [80], which use a 10-step solid-supported synthesis suitable for the preparation of large numbers of diverse saframycin analogues (including ETs) with deep-seated structural modifications.

In 1996, Corey *et al.* [164] synthesized ET-743 (4) via a convergent synthesis employing initially a hexacycle compound (Fig. 10 and compounds 38 to 42). Starting with



**Fig. (8).** Possible biosynthetic route of ET in the larvae and adult tissues of *E. turbinata* (A). Taking into account that symbiotic bacteria can be found in the tissues of *E. turbinata* (e.g. bacterial capsules inside the cells of pharynx) and considering the chemical similarity found between safracin and ET molecules, it is possible that aminoacids (aa) from the tissues of *E. turbinata* or from bacteria could be used for the biosynthesis of safracin. The safracin can be: (i) converted to ET in the bacterial cytoplasm by some unknown (?) route (dashed arrow), where it can be further transported to the capsule matrix or to the cytoplasm of pharynx cell or (ii) transported and accumulated into the capsule matrix and further to the cytoplasm of pharynx cell, where safracin is converted to ET by some unknown (?) biochemical pathway (dashed arrows). Abbreviations: plasma membrane (PM), capsule membrane (CM), bacterial lipopolysaccharide membrane (LPS). The proteobacteria cell, the bacterial capsule and the pharynx cell are indicated in the figure. In (B), a schematic drawing of a possible method to study the ET metabolic route in *E. turbinata*. Followed by the tissue extraction, homogenization and isolation of bacterial cells or capsules by gradient centrifugation from the tissues, both DNA and metabolites can be isolated and subjected to metagenomic and chemical analyses, respectively.

this hexacycle (**38**), a selective hydroxylation was accomplished using phenylselenic anhydride and was followed by the removal of the silyl ether and an esterification with a diprotected cysteine derivative, which results in the intermediate (**39**). Elimination of the tertiary alcohol under Swern conditions allowed for cyclization of the thiol to form (**40**) in 79% yield. Removal of the Alloc carbamate followed by transamination afforded *R*-keto lactone (**41**) in 59% yield. This *R*-keto lactone (**41**) was employed on the final three steps to ET-743 (**4**) synthesis, where the condensation of a homobenzylic amine (**42**) on the ketone followed by removal of the MOM group with TFA and finally conversion of the aminonitrile to the carbinolamine using silver(I) nitrate and water results in the formation of ET-743 (**4**) with a high yield (Fig. 7).

On the other hand, Cuevas *et al.* [152] were able to synthesize ET-743 (**4**) in a semisynthetic fashion starting with cyanosafrafrin B (Fig. 11 and compounds **43** to **48**), which is available in kilogram quantities via bacterial large-scale fermentation [152]. Cyanosafrafrin B (**43**) was converted into compound (**44**) via a four-step sequence, resulting in 49% yield. Removal of the Boc group from (**44**) was followed by amide cleavage via an Edman degradation scheme, which results in the compound (**45**) in 68% yield. Protection of the phenol allowed the diazotization of the primary amine for conversion to alcohol (**46**). This alcohol (**46**) served as base for the synthesis of ET-743 (**4**) using the chemistry of Corey *et al.* [164] on similar substrates. Basically, a three-step sequence was used to form compound (**47**) from alcohol (**46**). Dehydration under Swern conditions allowed the cyclization to afford (**48**) followed by the removal of the MOM and alloc protecting groups, resulting in ketone formation. Finally, the condensation of compound (**48**) with homobenzylic amine (**42**) and carbinolamine formation results in ET-743 (**4**) (Fig. 11).

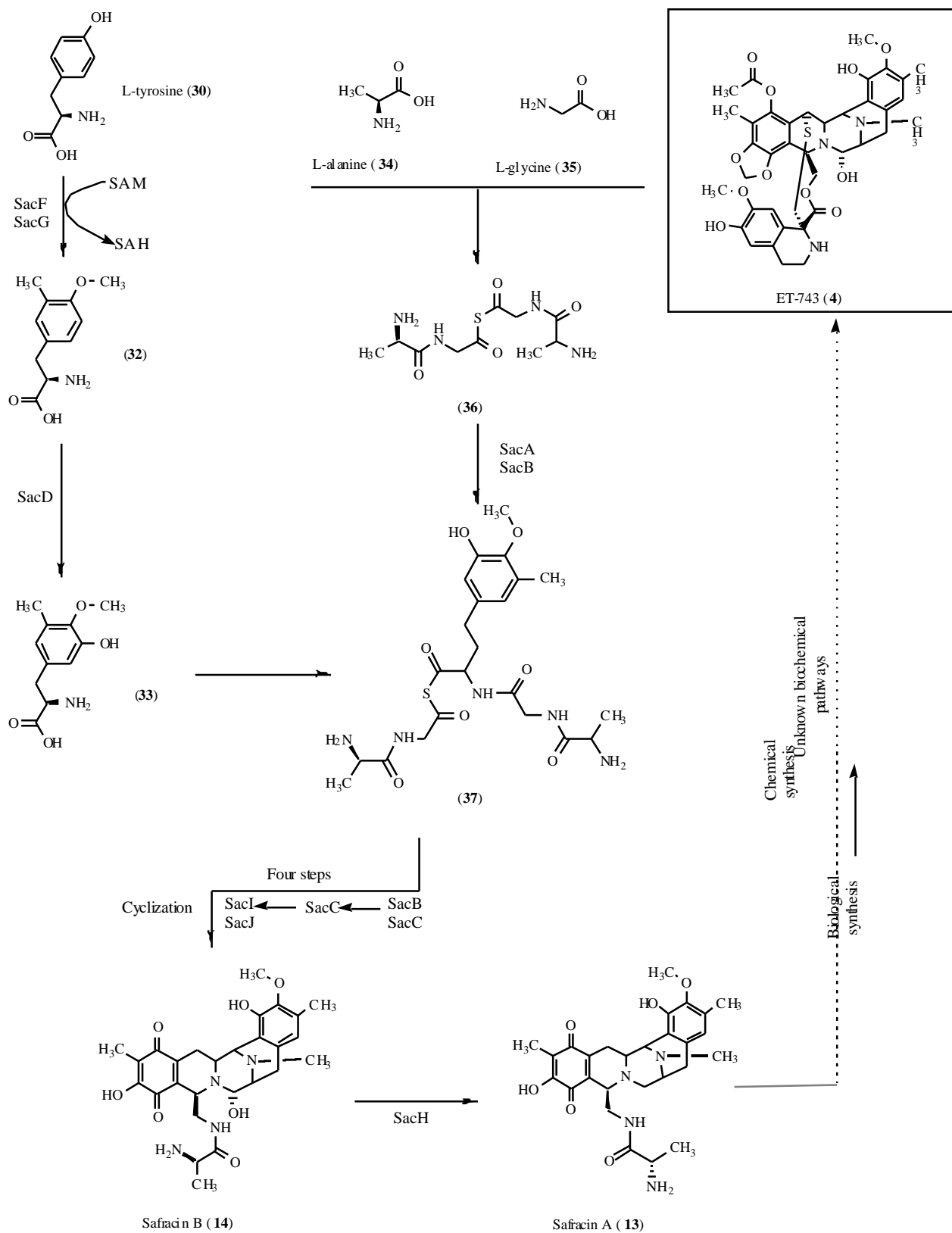
Endo *et al.* [165] synthesize ET-743 (**4**) starting with both compounds (**49**), a highly functionalized (*R*)-phenylglycinol derivative, and (**50**), a (*S*)-iodophenylalanine derivative (Fig. 12). Using the four-component condensation reaction [165], a mixture of compounds (**49**), (**50**), *p*-methoxyphenyl isocyanide and acetaldehyde results in the formation of the peptide (**51**) with a 90% of efficiency. The peptide (**51**) was used in a four-step reaction to result in the diketopiperazine (**52**), which was converted to the key intermediate (**53**) again by a four-step sequence involving mesylation of the phenol, introduction of a Boc group onto the lactam nitrogen, partial reduction of the ring carbonyl with NaBH<sub>4</sub>, and dehydration of the resultant hemiaminal derivative by treatment with CSA and quinoline. An intramolecular Heck reaction of the compound (**53**) was used to give the tricyclic nucleus as seen in compound (**54**). The compound (**54**) served as the starting base to a series of cyclization reactions (Fig. 12 and compounds **55** to **58**), which result in the pentacycle (**59**). Having succeeded in obtaining the key intermediate (**59**), a selective allylation of the phenols, cleavage of the acetyl group, and condensation of the resultant alcohol with L-cysteine derivative (**60**) furnished ester (**61**). Chemoselective hydrazinolysis of the thioacetate gave the thiol, which upon exposure to TFA in CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH smoothly underwent cyclization to give the ten-membered sulfide. Subsequent acetylation of the resultant

phenol gave compound (**62**) (71% in 2 steps). The last step in the Endo's ET-743 (**4**) synthesis was the construction of the last tetrahydroisoquinoline moiety using the same procedure of Corey *et al.* [164]. In this case, compound (**62**) reacts with the homobenzylic amine (**42**) in a seven-step procedure, resulting in ET-743 (**4**) in a 93% yield (Fig. 12).

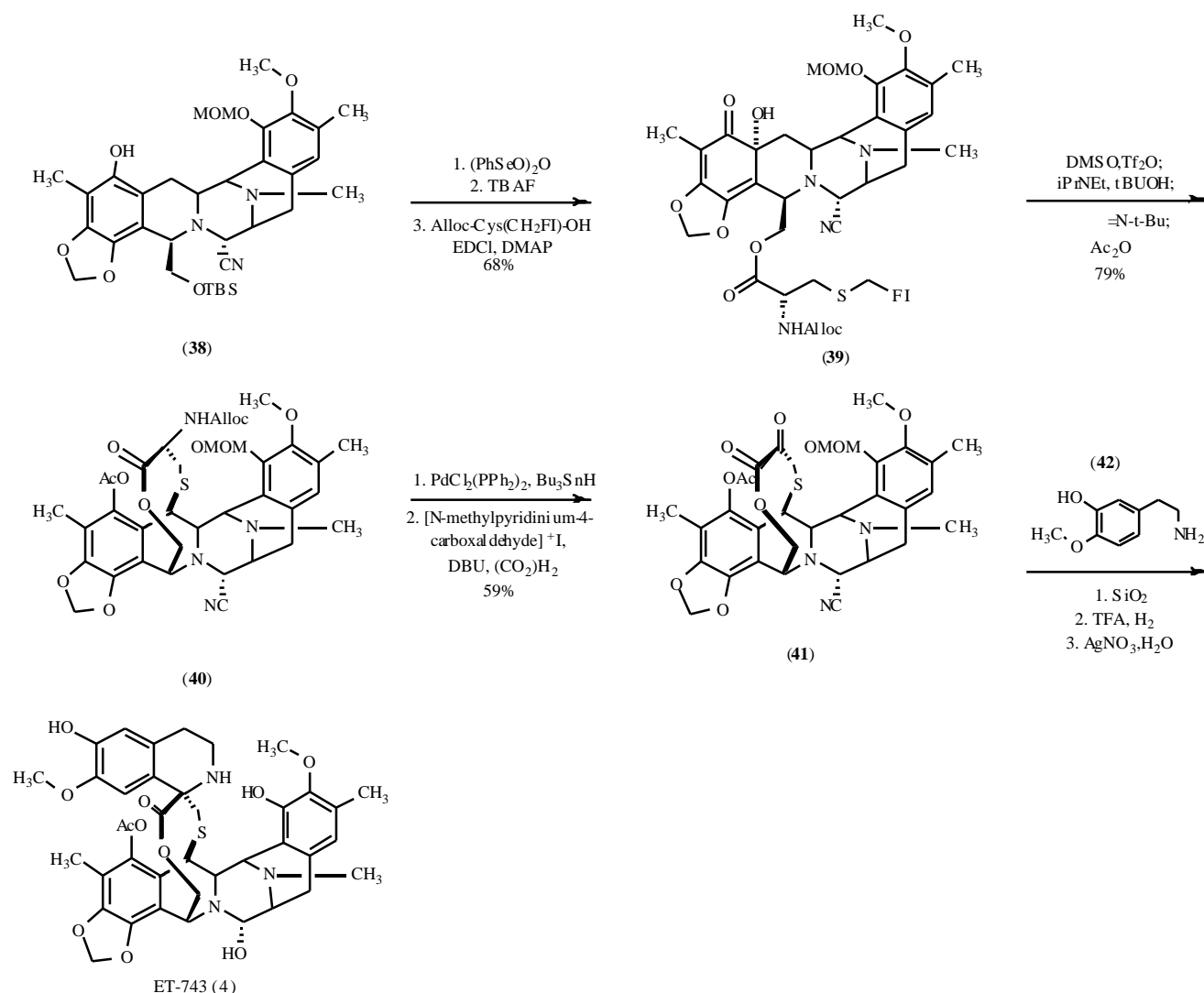
Modifications in the chemical procedures of Corey *et al.* [164] (Fig. 10), Cuevas *et al.* [152] (Fig. 11) and Endo *et al.* [165] (Fig. 12) are also used to establish a truly practical synthesis of the ETs analogues, as it is the case of ET-637 (**11**) and PT-650 (**12**). An analogous method based on the solid-phase synthesis of peptides was adapted to the synthesis of saframycin A by Myers and Lanman [80] (Fig. 13 and compounds **63** to **71**), and can be easily applied for the design of new ET molecules. The complete reaction could be achieved in a 10-step manner, initiating with the attachment of the solid support (**63**) to the anti-morpholino nitrile compound (**64**) by silyl ether formation with 4-(chlorodisopropylsilyl) polystyrene, resulting in the first resin-bound intermediate (**65**) with a 99% yield. Selective deprotection of the tertbutyldimethylsilyl ether group of resin-bound intermediate (**65**) occurred in 2-steps upon exposure to TBAF buffered with acetic acid followed by the treatment with piperidine in DMF affording the phenolic amine (**66**). Two steps of condensation and a stereoselective Pictet-Spengler cyclization reactions result in the tetrahydroisoquinoline derivative (**67**). The secondary amino group of the tetrahydroisoquinoline intermediate (**67**) formed in the first Pictet-Spengler cyclization is reductively methylated on the solid phase followed by the deprotection of the phenol and primary amino groups of the resulting *N*-alkylation product, given the new amino-terminal resin-bound intermediate (**68**). The second and final Pictet-Spengler cyclization reaction in the sequence then occur (concomitantly with imine formation) upon exposure of compound (**68**) to *N*-Fmoc glycinal in 1,2-dichloroethane, resulting in the bis-tetrahydroisoquinoline derivative (**69**). In the key step of the solid-phase sequence, the bis-tetrahydroisoquinoline intermediate (**69**) was subjected to cyclization-autorelease, resulting in the compounds (**70**) and (**71**) (Fig. 13). Interestingly, the authors were able to synthesize a 16-membered library of saframycin A analogues bearing varied C1 and N12 substituents by parallel synthesis using compounds (**67**) and (**71**) [80]. As described by the authors, this parallel synthesis provided 0.5-2.0-mg quantities of the bis-hydroquinone products in 9-26% overall yield [from compound (**64**)], typically with 95% purity, representing an average yield of 79-87% per step over the 10-step solid-phase sequence [80].

## CONCLUDING REMARKS

ETs are remarkable molecules with a unique and very interesting mechanism of action. Since its discovery and isolation from *E. turbinata* aqueous extracts, ETs has been subject to various studies regarding its mechanism of action in both normal and transformed cells. It is interesting that this family of substances, related to the tetrahydroisoquinoline compounds, show a distinct biological mode of action, becoming an excellent drug, alone or in combination with standard antitumoral drugs, for the clinical treatment of STSs and other fatal diseases. The best-



**Fig. (9).** Anabolic pathway for safracin A (13) and safracin B (14) synthesis in bacterial cell from amino acids and metabolite precursors (compounds 32 to 37). Please refer to the main text of this review for additional details. The enzymes Sac, necessary for each metabolic step of safracin biosynthesis, are indicated in the figure. Moreover, the conversion of safracin A (13) to ET-743 (4) by chemical synthesis or by an unknown biochemical pathway is suggested (dashed arrow).



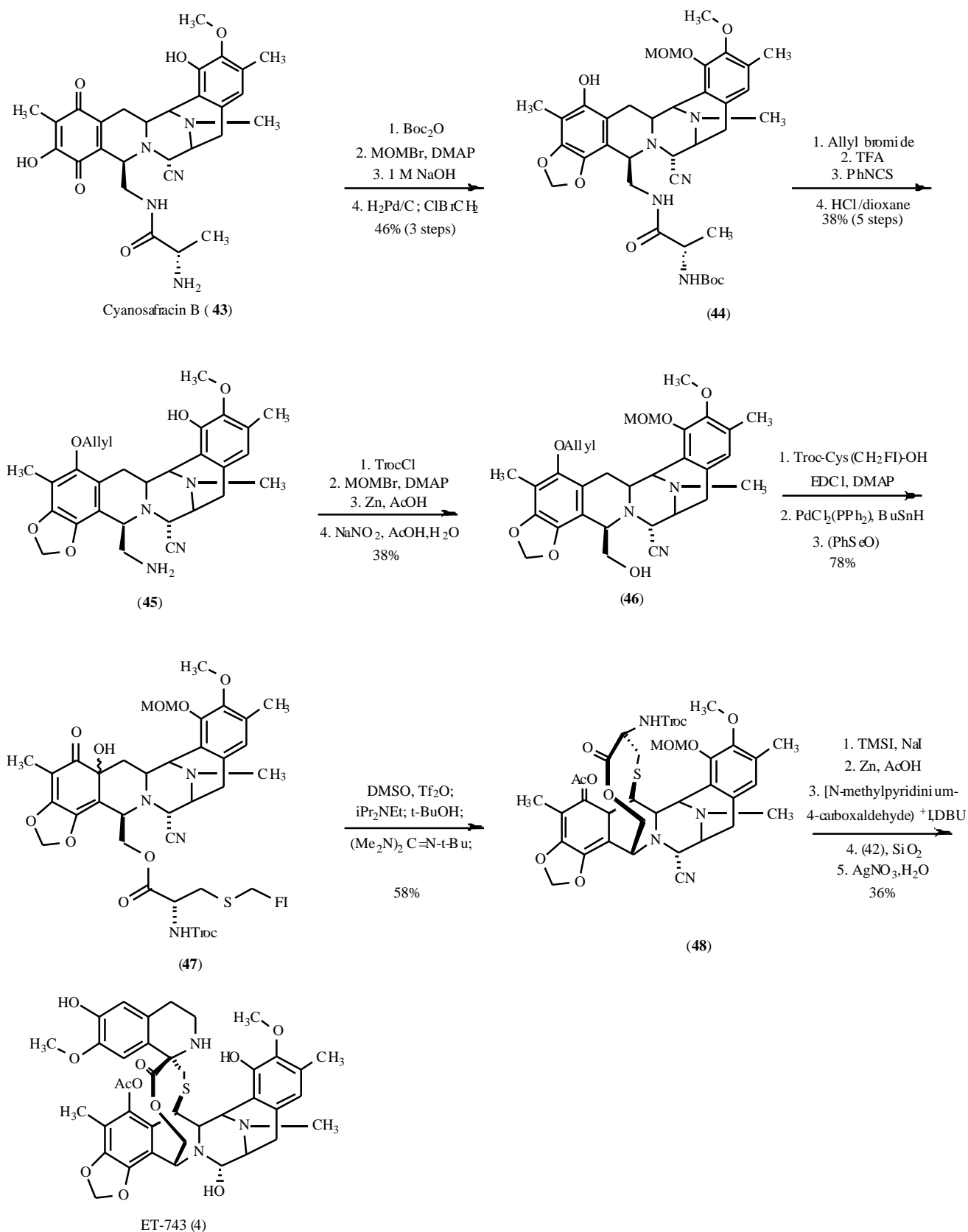
**Fig. (10).** Total synthesis of ET-743 (4) by the procedure of Corey *et al.* [164]. Please refer to the main text of this review for additional details.

studied member of ET family, ET-743 (4), is actually in phase III of clinical trial, and may become a new therapeutic option in the systemic treatment of advanced malignancies, such as the STSs

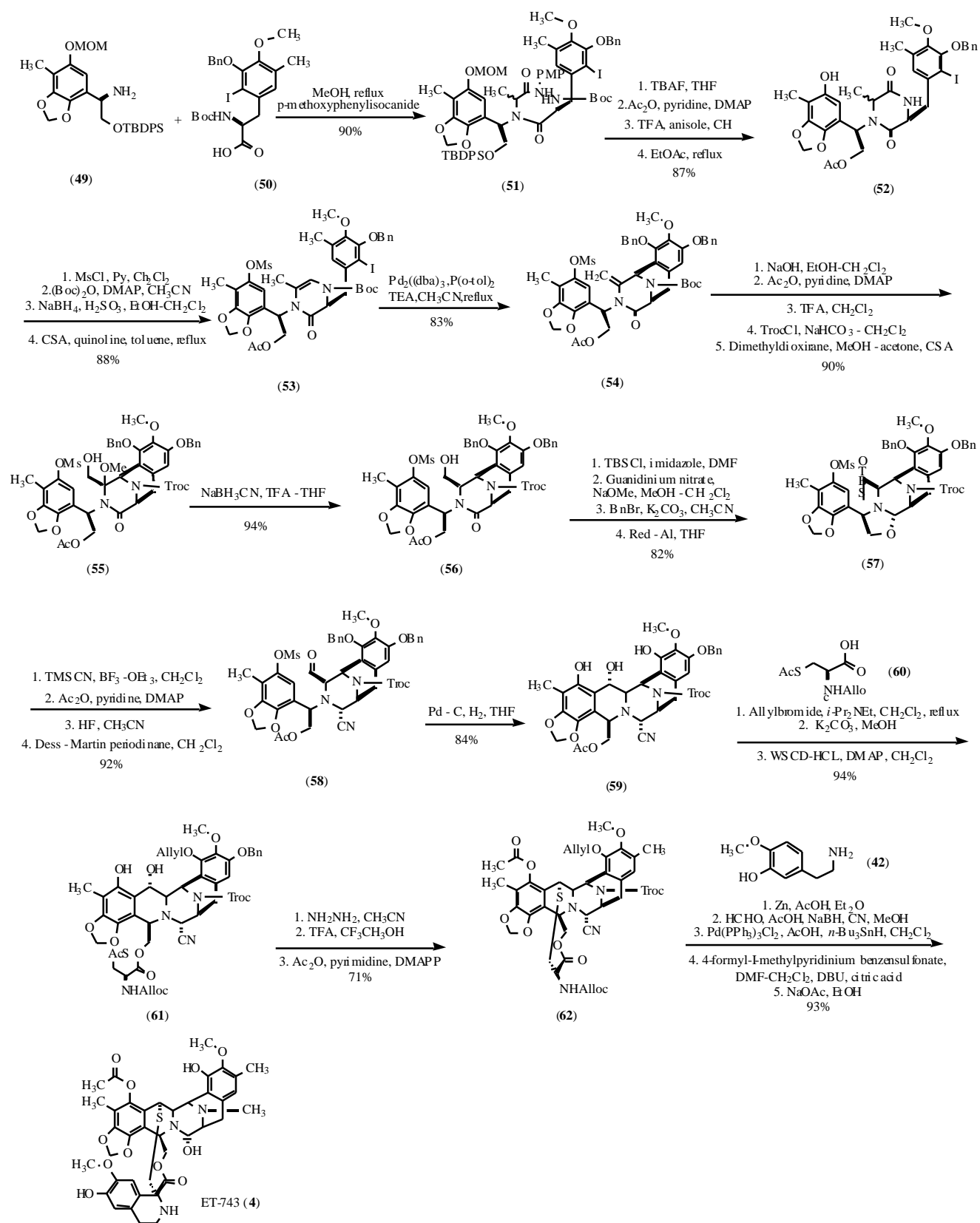
Despite the considerable progress realized during the last 15 years in terms of elucidation of the major cellular targets of ETs, much work is still needed in order to fully understand how these molecules act selectively toward tumor cells like STSs. As noted in this review the ETs [especially ET-743 (4)], have multiple targets, including DNA repair mechanisms, cell cycle, DNA replication and transcription, cellular differentiation, and the inflammatory processes. It is reasonable to assume that ETs also act on additional cellular targets, making these drugs very attractive for application in different clinical therapies. In this sense, it becomes imperative to discover how these molecules are metabolized *in vivo* and to determine which metabolites are biologically active in the cell. The metabolic analyses of ETs will allow the design of tailored-made molecules for determined

clinical applications, e.g. STSs treatment or inflammatory processes.

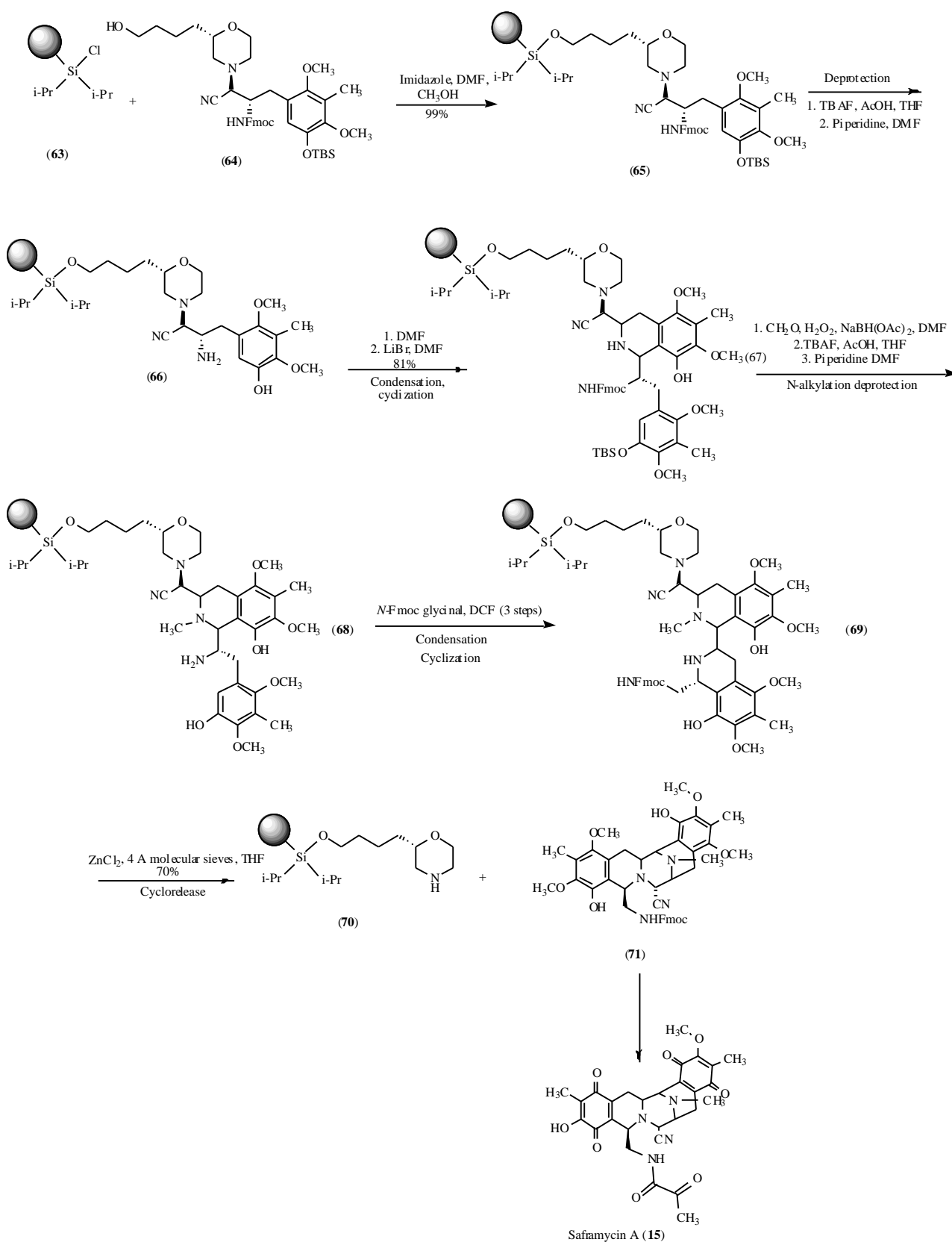
Considering that ETs are molecules isolated from ascidian species, the role of these compounds in ascidian tissues and how they are produced is another interesting subject. It is very plausible that ETs serve as the ascidian's chemical defense against predatory organisms and are produced by symbiotic  $\gamma$ -proteobacteria living in the pharynx or in the tunica tissues. In this sense, the analyses of the ET metabolic pathways will also allow the production of these molecules by means of biotechnological processes. The current strategy to obtain ETs on a large, commercial scale, is based on chemical synthesis using simple chemical precursors or from tetrahydroisoquinoline molecules synthesized by microorganism from industrial fermentation. One potential advantage of the chemical synthesis is the possibility to produce ET-analogues, which possess new chemical properties of potential biological interest, as is the case of ET-637 (11) and PT-650 (12). These chemical



**Fig. (11).** Total synthesis of ET-743 (4) by the procedure of Cuevas *et al.* [152]. Please refer to the main text of this review for additional details.



**Fig. (12).** Total synthesis of ET-743 (4) by the procedure of Endo *et al.* [165]. Please refer to the main text of this review for additional details.



**Fig. (13).** Solid-phase synthesis of saframycin A (15) by the procedure of Myers and Lanman [80]. Please refer to the main text of this review for additional details.



processes open the door for the synthesis and design of new tailored made compounds with future medical applications.

Again, the implementation of structure-activity relationships, mode of action and metabolic processing of ETs in mammalian cells, associated with chemical or biotechnological synthesis and design of new ET-analogues, will allow the identification of new candidate compounds with a more favorable therapeutic index to be brought into clinic evaluation.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX, UFRGS). D. G. Soares held fellowship from CAPES.

#### ABBREVIATIONS

BER	=	Base excision repair
CCL2	=	Chemokine (C-C motif) ligand 2
COMP	=	European Commission's Committee for Orphan Medicinal Products
CPMP	=	EU's Committee for Proprietary Medicinal Products
CYPs	=	Cytochrome P-450 enzymes
DNA-PKcs	=	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSBs	=	DNA double-strand breaks
EMA	=	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESCA	=	Electron spectroscopy for chemical analysis
ETs	=	Ecteinascidins
FABMS	=	fast Atom bombardment mass spectrometry
FDA	=	U. S. Food and Drugs Administration
HPLC/MS	=	High performance liquid chromatography associated with mass spectrometry analyses
HR	=	Homologous recombination
HRFABMS	=	High resolution fast atom bombardment mass spectrometry
hTERT	=	human telomerase reverse transcriptase
I3C	=	Indole-3-carbinol
IC <sub>50</sub>	=	Inhibitory concentration (50%)
IL-6	=	Interleukin-6
LC-MS	=	Laser capture-mass spectrometry analyses
NER	=	Nucleotide excision repair
NHEJ	=	Non-homologous end joining
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
NRPS	=	Non-ribosomal peptide synthetase

PARP	=	Poly(ADP-ribose) polymerase
ppm	=	Parts per million
SSBs	=	DNA single-strand breaks
STSs	=	Soft tissue sarcomas
TAMs	=	Tumor-associated macrophages
TC-NER	=	Transcription-coupled NER
TLS	=	Translesion synthesis
Top1/Top2	=	DNA topoisomerase type I and type II, respectively
WT	=	Wild type

#### REFERENCES

- Habrand, J. L.; Le Pechoux, C. R. *Ann. Oncol.*, **2004**, *15*, iv187.
- Delaloge, S.; Yovine, A.; Taamma, A.; Riofrío, M.; Brain, E.; Raymond, E.; Cottu, P.; Goldwasser, F.; Jimeno, J.; Misset, J. L.; Marty, M.; Cvitkovic, E. *J. Clin. Oncol.*, **2001**, *19*, 1248.
- Levenson, V. V.; Davidovich, I. A.; Roninson, I. B. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 5027.
- Cvijic, M. E.; Chin, K. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, *249*, 723.
- Ohga, T.; Koike, K.; Ono, M.; Makino, Y.; Itagaki, Y.; Tanimoto, M.; Kuwano, M.; Kohno, K. *Cancer Res.*, **1996**, *56*, 4224.
- Bargou, R. C.; Jurchott, K.; Wagener, C.; Bergmann, S.; Metzner, S.; Bommert, K.; Mapara, M. Y.; Winzer, K. J.; Dietel, M.; Dorken, B.; Royer, H. D. *Nat. Med.*, **1997**, *3*, 447.
- Schwartzmann, G.; Da Rocha, A. B.; Mattei, J.; Lopes, R. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **2003**, *12*, 1367.
- Proksch, P.; Edrada, R. A.; Ebel, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, *59*, 125.
- Mans, R. A.; Brondani da Rocha, A.; Schwartzmann, G. *Oncologist*, **2000**, *5*, 185.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Weiss, R. B. *Semin. Oncol.*, **1997**, *24*, 156.
- Jimeno, J.; Lopez-Martin, J. A.; Ruiz-Casado, A.; Izquierdo, M. A.; Scheuer, P. J.; Rinehart, K. *Anticancer Drugs*, **2004**, *15*, 321.
- Schwartzmann, G.; Brondani da Rocha, A.; Berlinck, R.G. S.; Jimeno, J. *Lancet Oncology*, **2001**, *2*, 221.
- Weinheimer, A. J.; Spraggins, R. L. *Tetrahedron Lett.*, **1969**, *15*, 5185.
- Mendola, D. *Biomol. Eng.*, **2003**, *20*, 441.
- Okami, Y. *Microb. Ecol.*, **1986**, *12*, 65.
- Gill-Turnes, M. S.; Fenical, W. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, **1992**, *182*, 105.
- Fenical, W. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1673.
- Unison, M. D.; Holland, N. D.; Faulkner, D. J. *Mar. Biol.*, **1994**, *119*, 1.
- Vacelet, J.; Donadey, C. *J. Exp. Mar. Ecol.* **1977**, *30*, 301.
- Vacelet, J. *J. Microsc. Biol. Cell.*, **1975**, *23*, 271.
- Friedrich, A. B.; Merkert, H.; Fendert, T.; Hacker, J.; Proksch, P.; Hentschel, U. *Mar. Biol.*, **1999**, *134*, 461.
- Elyakov, G. B.; Stonik, V. A.; Kuznetsova, T. A.; Mikhailov, V. V.; Maltsev, I. I.; Voinov, V. G.; Fedoreyev, S. A. *Experientia*, **1991**, *47*, 632.
- Stierle, A. C.; Cardellina, J. H.; Singleton, F. L. *Experientia*, **1988**, *44*, 1021.
- Bhosale, S. H.; Nagle, V. L.; Jagtap, T. G. *Mar. Biotechnol.*, **2002**, *4*, 111.
- Kon-Ya, K.; Shimidzu, N.; Otaki, N.; Yokoyama, A.; Adachi, K.; Miki, W. *Experientia*, **1995**, *51*, 153.
- Sings, H. L.; Rinehart, K. L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **1996**, *17*, 385.
- Moore, B. S. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 653.
- Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 1.
- Piel, J. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 519.
- Pisut, D. P.; Pawlik, J. R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2002**, *270*, 203.
- Chanas, B.; Pawlik, J. R. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **1995**, *127*, 195.
- Chanas, B.; Pawlik, J. R. *Oecologia*, **1996**, *107*, 225.

- [33] Lindquist, N.; Hay, M. E.; Fenical, W. *Ecol. Monogr.*, **1992**, *62*, 547.
- [34] Faulkner, D.J. *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *1*, 7.
- [35] Paul, V. J.; Lindquist, N.; Fenical, W. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **1990**, *59*, 109.
- [36] McClintock, J. B.; Heine, J.; Slattery, M.; Weston, J. J. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1991**, *147*, 163.
- [37] Vervoort, H. C.; Pawlik, J. R.; Fenical, W. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1998**, *164*, 221.
- [38] Young, C. M.; Bingham, B. L. *Mar. Biol.*, **1987**, *96*, 539.
- [39] Lindquist, N.; Fenical, W. *Experientia*, **1991**, *47*, 504.
- [40] Lindquist, N.; Hay, M. E. *Ecology*, **1995**, *76*, 1347.
- [41] Lindquist, N.; Hay, M. E. *Ecol. Monogr.*, **1996**, *66*, 431.
- [42] Moss, C.; Green, D. H.; Pérez, B.; Velasco, A.; Henríquez, R.; McKenzie, J. D. *Mar. Biol.*, **2003**, *143*, 99.
- [43] Berrill, N. J. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **1932**, *62*, 77.
- [44] Young, C. M.; Bingham, B. L. *Mar. Biol.*, **1987**, *96*, 539.
- [45] Bingham, B. L.; Young, C. M. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1991**, *145*, 189.
- [46] Bingham, B. L.; Young, C. M. *Mar. Ecol.* **1995**, *16*, 145.
- [47] Sigel, M. M.; Wellham, L. L.; Lichter, W.; Dudeck, L. E.; Gargus, J. L.; Lucas, L. H. In *Food-Drugs From the Sea, Proceedings*, Youngken, H. W., Ed.; Marine Technology Society: Washington DC, **1970**; pp 281-295.
- [48] Dunn, W.C.; Carrier, W.L.; Regan, J.D. *Toxicol.*, **1982**, *20*, 703.
- [49] Sasaki, T.; Uchida, N.A.; Uchida, H.; Takasuka, N.; Kamiya, H.; Endo, Y.; Tanaka, M.; Hayashi, T.; Shimizu, Y. *J. Pharmacobiodyn.*, **1985**, *8*, 969.
- [50] Lichter, W.; Lopez, D. M.; Wellham, L. L.; Sigel, M. M. *Fed. Proc.*, **1975**, *34*, 1005.
- [51] Lichter, W.; Wellham, L. L.; Sigel, M. M.; Ghaffar, A. J. *Immunol.*, **1979**, *122*, 8.
- [52] Sigel, M. M.; McCumber, L. J.; Hightower, J. A.; Hayasaka, S. S.; Huggins E. M.; Davis, J. F. *Am. Zool.*, **1983**, *23*, 221.
- [53] Wright, A. E.; Forleo, D. A.; Gunawardana, G. P.; Gunasekera, S. P.; Koehn, F. E.; McConnell, O. J. *J. Org. Chem.*, **1990**, *ri5*, 4508.
- [54] Holt, T. G. *Chem. Abstr.*, **1987**, *106*, 1931.
- [55] Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4512.
- [56] Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 13303.
- [57] Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1669.
- [58] Frincke, J. M.; Faulkner, D. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 265.
- [59] He, H.-Y.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 5822.
- [60] Davidson, B. S. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3721.
- [61] Parameswaran, P. S.; Nalik, C. G.; Kamat, S. Y. *Ind. J. Chem.*, **1998**, *38B*, 1258.
- [62] Fontana, A.; Cavaliere P.; Wahidulla, S.; Naik, C. G.; Cimino, G. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7305.
- [63] Pettit, G.; Knight, J. C.; Collins, J. C.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Boyd, M. R.; Young, V. G. *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 793.
- [64] Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Guan, Y.; Wang, A. H.-J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1992**, *89*, 11456.
- [65] Sakai, R.; Jares-Erijman, E. A.; Manzanera, I.; Silva Elipse, M. V.; Rinehart, K. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9017.
- [66] Suwanborirux, K.; Charupant, K.; Amnuoypol, S.; Pummangura, S.; Kubo, A.; Saito, N. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 935.
- [67] Oku, N.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1136.
- [68] Guan, Y.; Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Wang, A. H. J. *Biomol. Struct. Dyn.*, **1993**, *10*, 793.
- [69] Izbicka, E.; Lawrence, R.; Raymond, E.; Eckhardt, G.; Faircloth, G.; Jimeno, J.; Clark, G.; Von Hoff, D. D. *Ann. Oncol.*, **1998**, *9*, 981.
- [70] Rinehart, K. L. *Med. Res. Rev.*, **2000**, *20*, 1.
- [71] Jimeno, J.; Faircloth, G.; Cameron, L.; Meely, K.; Vega, E.; Gomez, A.; Fernandez, Sousa-Faro, J. M.; Rinehart, K. *Drugs Future*, **1996**, *21*, 1115.
- [72] Damia, G.; Silvestri, S.; Carrassa, L.; Filiberti, L.; Faircloth, G. T.; Liberi, G.; Foiani, M.; D'Incalci, M. *Int. J. Cancer*, **2001**, *92*, 583.
- [73] Takebayashi, Y.; Pourquier, P.; Zimonjic, D. B.; Nakayama, K.; Emmert, S.; Ueda, T.; Urasaki, Y.; Konzaki, A.; Akitama, S.; Popescu, N.; Kraemer, K. H.; Pommier, Y. *Nat. Med.*, **2001**, *7*, 961.
- [74] Zewail-Foote, M.; Li, V. S.; Kohn, H.; Bearss, D.; Guzman, M.; Hurley, L. H. *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 1033.
- [75] Soares, D. G.; Poletto, N. P.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Schwartzmann, G.; Henriques, J. A. P. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, *70*, 59.
- [76] D'Incalci, M.; Colombo, T.; Ubezio, P.; Nicoletti, I.; Giavazzi, R.; Erba, E.; Ferrarese, L.; Meço, D.; Riccardi, R.; Sessa, C.; Cavallini, E.; Jimeno, J.; Faircloth, G. T. *Eur. J. Cancer*, **2003**, *39*, 1920.
- [77] Poindessous, V.; Koepfel, F.; Raymond, E.; Comisso, M.; Waters, S. J.; Larsen, A. K. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, 2817.
- [78] Suwanborirux, K.; Charupant, K.; Amnuoypol, S.; Pummangura, S.; Kubo, A.; Saito, N. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 935.
- [79] Myers, A. G.; Plowright, A. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5114.
- [80] Myers, A. G.; Lanman, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12969.
- [81] Moore, B. M., II; Seaman, F. C.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5475.
- [82] Moore, B. M., II; Seaman, F. C.; Wheelhouse, R. T.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2490.
- [83] Chawla, A. K.; Tomasz, M. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1988**, *6*, 459.
- [84] Petrusek, R. L.; Anderson, G. L.; Garner, T. F.; Fannin, Q. L.; Kaplan, D. J.; Zimmer, S. G.; Hurley, L. H. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 1111.
- [85] Hill, G. C.; Remers, W. A. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1990.
- [86] Rao, K.; Lown, J. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 12076.
- [87] Zewail-Foote, M.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2493.
- [88] Erba, E.; Cavallaro, E.; Damia, G.; Mantovani, R.; Di Silvio, A.; Di Francesco, A. M.; Riccardi, R.; Cuevas, C.; Faircloth, G. T.; D'Incalci, M. *Oncol. Res.*, **2004**, *14*, 579.
- [89] Monsarrat, B.; Royer, I.; Wright, M.; Cresteil, T. *Bull. Cancer*, **1997**, *84*, 125.
- [90] Synold, T. W.; Dussault, I.; Forman, B.M. *Nat. Med.*, **2001**, *7*, 584.
- [91] Kanzaki, A.; Takebayashi, Y.; Ren, X. Q.; Miyashita, H.; Mori, S.; Akiyama, S.; Pommier, Y. *Mol. Cancer Therapeutics*, **2002**, *1*, 1327.
- [92] Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2000**, *97*, 6775.
- [93] D'Incalci, M.; Erba, E.; Damia, G.; Galliera, E.; Carrassa, L.; Marchini, S.; Mantovani, R.; Tognon, G.; Fruscio, R.; Jimeno, J.; Faircloth, G.L. *Oncologist*, **2002**, *7*, 210.
- [94] Marchini, S.; Marrazzo, E.; Bonomi, R.; Chiorino, G.; Zaffaroni, M.; Weissbach, L.; Hornicek, F. J.; Brogini, M.; Faircloth, G. T.; D'Incalci, M. *Eur. J. Cancer*, **2005**, *41*, 323.
- [95] Minuzzo, M.; Marchini, S.; Brogini, M.; Faircloth, G.; D'Incalci, M.; Mantovani, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2000**, *97*, 6780.
- [96] Friedman, D.; Hu, Z.; Kolb, E. A.; Gorfajn, B.; Scotto, K. W. *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 3377.
- [97] Pommier, Y.; Pourquier, P.; Urasaki, Y.; Wu, J.; Laco, G. S. *Drug Resistance Updates*, **1999**, *2*, 307.
- [98] Moro, S.; Beretta, G. L.; Dal Ben, D.; Nitiss, J.; Palumbo, M.; Capranico, G. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 7503.
- [99] Pommier, Y.; Pourquier, P.; Fan, Y.; Strumberg, D. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1400*, 83.
- [100] Heron, J. F. *Oncologist*, **1998**, *3*, 390.
- [101] Cunningham, D. *Semin. Oncol.*, **1999**, *26*, 1.
- [102] Rothenberg, M. L. *Ann. Oncol.*, **1997**, *8*, 837.
- [103] Larsen, A. K.; Gilbert, C.; Chyzak, G.; Plisov, S. Y.; Naguibneva, I.; Laverne, O.; Lesueur-Ginot, L.; Bigg, D. C. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 2961.
- [104] Laverne, O.; Bigg, D. C. *Bull. Cancer*, **1998**, *51*.
- [105] Takebayashi, Y.; Pourquier, P.; Yoshida, A.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1999**, *96*, 7196.
- [106] Damia, G.; Silvestri, S.; Carrassa, L.; Filiberti, L.; Faircloth, G.T.; Liberi, G.; Foiani, M.; D'Incalci, M. *Int. J. Cancer*, **2001**, *92*, 583.
- [107] Martinez, E. J.; Owa, T.; Schreiber, S. L.; Corey, E. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, *96*, 3496.
- [108] Takebayashi, Y.; Goldwasser, F.; Urasaki, Y.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*, 185.
- [109] Li, W. W.; Takahashi, N.; Jhanwar, S.; Cordon-Cardo, C.; Elisseyeff, Y.; Jimeno, J.; Faircloth, G.; Bertino, J. R. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*, 2908.
- [110] Martinez, E. J.; Corey, E. J.; Owa, T. *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 1151.
- [111] Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G. T.; D'Incalci, M. *Eur. J. Cancer*, **2001**, *37*, 97.
- [112] Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 41580.

- [113] Crosio, C.; Fimia, G. M.; Loury, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Zhou, H.; Sen, S.; Allis, C. D.; Sassone-Corsi, P. *Mol. Cell. Biol.*, **2002**, *22*, 874.
- [114] Liang, D. T.; Hodson, J. A.; Forsburg, S. L. *J. Cell Sci.*, **1999**, *112*, 559.
- [115] Horne, M. C.; Goolsby, G. L.; Donaldson, K. L.; Tran, D.; Neubauer, M.; Wahl, A. F. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 6050.
- [116] Horne, M. C.; Donaldson, K. L.; Goolsby, G. L.; Tran, D.; Mulheisen, M.; Hell, J. W.; Wahl, A. F. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 12650.
- [117] Yang, Q.; Manicone, A.; Coursen, J. D.; Linke, S. P.; Nagashima, M.; Forgues, M.; Wang, X. W. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 36892.
- [118] Ando, T.; Kawabe, T.; Ohara, H.; Ducommun, B.; Itoh, M.; Okamoto, T. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 42971.
- [119] Martínez, N.; Sánchez-Beato, M.; Camero, A.; Moneo, V.; Terceiro, J. C.; Fernández, I.; Navarrete, M.; Jimeno, J.; Piris, M. A. *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, *4*, 814-823.
- [120] Biroccio, A.; Gabellini, C.; Amodei, S.; Benassi, B.; Del Bufalo, D.; Elli, R.; Antonelli, A.; D'Incalci, M.; Zupi, G. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *63*, 632.
- [121] Allavena, P.; Signorelli, M.; Chieppa, M.; Erba, E.; Bianchi, G.; Marchesi, F.; Olimpico, C. O.; Bonardi, C.; Garbi, A.; Lissoni, A.; de Braud, F.; Jimeno, J.; D'Incalci, M. *Cancer Res.*, **2005**, *6*, 507.
- [122] Takebayashi, Y.; Pourquier, P.; Zimonjic, D.B.; Nakayama, K.; Emmert, S.; Ueda, T.; Urasaki, Y.; Konzaki, A.; Akitama, S.; Popescu, N.; Kraemer, K.H.; Pommier, Y. *Nat. Med.*, **2001**, *7*, 961.
- [123] Bailly, V.; Sommers, C. H.; Sung, P.; Prakash, L.; Prakash, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 8273.
- [124] Bardwell, L.; Cooper, A. J.; Friedberg, E. C. *Mol. Cell Biol.*, **1992**, *12*, 3041.
- [125] Damia, G.; Imperatori, L.; Stefanini, M.; D'Incalci, M. *Int. J. Cancer*, **1996**, *66*, 779.
- [126] Drummond, J. T.; Anthoney, A.; Brown, R.; Modrich, P. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 19645.
- [127] Fink, D.; Zheng, H.; Nebel, S.; Norris, P. S.; Aebi, S.; Lin, T. P.; Nehme, A.; Christen, R. D.; Haas, M.; MacLeod, C. L.; Howell, S. B. *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 1841.
- [128] Mandola, M. V.; Kolb, E. A.; Scotto, K. W. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2005**, 4122.
- [129] Audebert, M.; Salles, B.; Calsou, P. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 55117.
- [130] Held-Warmkessel, J. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, **2003**, *7*, 313.
- [131] Takahashi, N.; Li, W. W.; Banerjee, D.; Scotto, K. W.; Bertino, J. R. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*, 3251.
- [132] Simoons, C.; Korst, A. E. C.; De Pooter, C. M. J.; Lambrechts, H. A. J.; Pattyn, G. G. O.; Faircloth, G. T.; Lardon, F.; Vermorken, J. B. *Br. J. Cancer*, **2003**, *89*, 2305.
- [133] Reid, J. M.; Kuffel, M. J.; Ruben, S. L.; Morales, J. J.; Rinehart, K. L.; Squillace, D. P.; Ames, M. M. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, *8*, 2952.
- [134] Sparidans, R. W.; Rosing, H.; Hillebrand, M. J.; Lopez-Lazaro, L.; Jimeno, J. M.; Manzanares, I.; van Kesteren, C.; Cvitkovic, E.; van Oosterom, A. T.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H. *Anticancer Drugs*, **2001**, *12*, 653.
- [135] Reid, J. M.; Walker, D. L.; Ames, M. M. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1996**, *38*, 320.
- [136] Hill, J. R.; Schindler-Horvat, J. E.; Baldwin, R. C.; MacGregor, J. T.; Osborn, B. L.; Donohue, S. J.; Tyson, C. A. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1994**, *35*, 467.
- [137] Hendriks, H. R.; Fiebig, H. H.; Giavazzi, R.; Langdon, S. P.; Jimeno, J. M.; Faircloth, G. T. *Ann. Oncol.*, **1999**, *10*, 1233.
- [138] Valoti, G.; Nicoletti, M. I.; Pellegrino, A.; Jimeno, J.; Hendriks, H.; D'Incalci, M.; Faircloth, G.; Giavazzi, R. *Clin. Cancer Res.*, **1998**, *4*, 1977.
- [139] Garcia-Carbonero, R.; Supko, J. G.; Manola, J.; Seiden, M. V.; Harmon, D.; Ryan, D. P.; Quigley, M. T.; Merriam, P.; Canniff, J.; Goss, G.; Matulonis, U.; Maki, R. G.; Lopez, T.; Puchalski, T. A.; Sancho, M. A.; Gomez, J.; Guzman, C.; Jimeno, J.; Demetri, G. D. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 1480.
- [140] Yovine, A.; Riofrio, M.; Blay, J. Y.; Brain, E.; Alexandre, J.; Kahatt, C.; Taamma, A.; Jimeno, J.; Martin, C.; Salhi, Y.; Cvitkovic, E.; Misset, J. L. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 890.
- [141] Donald, S.; Verschoyle, R. D.; Greaves, P.; Gant, T. W.; Colombo, T.; Zaffaroni, M.; Frapolli, R.; Zucchetti, M.; D'Incalci, M.; Meco, D.; Riccardi, R.; Lopez-Lazaro, L.; Jimeno, J.; Gascher, A. J. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 5902.
- [142] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1216.
- [143] PharmaMar website [<http://www.pharmamar.com/>].
- [144] Twelves, C.; Hoekman, K.; Bowman, A.; Vermorken, J. B.; Anthoney, A.; Smyth, J.; van Kesteren, C.; Beijnen, J. H.; Ueters, J.; Wanders, J.; Gomez, J.; Guzman, C.; Jimeno, J.; Hanauske, A. *Eur. J. Cancer*, **2003**, *39*, 1842.
- [145] Scotlandi, K.; Perdichizzi, S.; Manara, M. C.; Serra, M.; Benini, S.; Cerisano, V.; Strammiello, R.; Mercuri, M.; Reverter-Branchat, G.; Faircloth, G.; D'Incalci, M.; Picci, P. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, *8*, 3893.
- [146] van Kesteren, C.; de Vooght, M. M. M.; Lopez-Lazaro, L.; Mathot, R.A. A.; Schellens, J. H. M.; Jimeno, J. M.; Beijnen, J. H. *Anticancer Drugs*, **2003**, *14*, 487.
- [147] Laverdiere, C.; Kolb, C. A.; Supko, J. G.; Gorlick, R.; Meyers, P. A.; Maki, R. G.; Wexler, L.; Demetri, G. D.; Healey, J. H.; Huvos, A. G.; Goorin, A. M.; Bagatell, R.; Ruiz-Casado, C.; Jimeno, J.; Harmon, D. *Cancer*, **2003**, *98*, 832.
- [148] Gianni, L.; Grasselli, G.; De Braud, F.; Curigliano, G.; Noberasco, C.; Marsoni, S.; Bartosek, A.; Perez, C.; Jimeno, J.; Zucchetti, M.; D'Incalci, M.; Viganò, L.; Bianchini, G.; Sessa, C. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, A49.
- [149] Chu, Q. S.; Forouzes, B.; Schwartz, G. H.; Jones, C.; Garrison, M.; Goldston, M.; Jimeno, J.; Izquierdo, M.; Flores, L.; Rosing, H.; Tolcher, A. W.; Rowinsky, E. K. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, A47.
- [150] Ker, R. G.; Miranda, N. F. *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1618.
- [151] Jeedigunta, S.; Krenisky, J. M.; Kerr, R. G. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 3303.
- [152] Cuevas, C.; Pérez, M.; Martín, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; García, J.; Polanco, C.; Rodríguez, I.; Manzanares, I. *Organic Letters*, **2000**, *2*, 2545.
- [153] Hirose, E.; Saito, Y. *Hiyoshi Rev. Nat. Sci.*, **1992**, *12*, 108.
- [154] Hirose, E.; Aoki, M.; Chiba, K. *Zool. Sci.*, **1996**, *13*, 519.
- [155] Hirose, E.; Maruyama, T.; Cheng, L.; Lewin, R. A. *Symbiosis*, **1998**, *25*, 301.
- [156] Mackie, G. O.; Singla, C. L. *Biol. Bull.*, **1987**, *173*, 188.
- [157] Groepler, W.; Kümmel, G. *Zool. Jb. Anat.*, **1988**, *117*, 207.
- [158] Webster, N. S.; Wilson, K. J.; Blackall, L. L.; Hill, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*, 434.
- [159] Distel, D. L.; DeLong, E. F.; Waterbury, J. B. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1991**, *57*, 2376.
- [160] Dubilier, N.; Mulders, C.; Ferdelman, T.; de Beer, D.; Pernthaler, A.; Klein, M.; Wagner, M.; Erseus, C.; Thierman, F.; Krieger, J.; Giere, O.; Amann, R. *Nature*, **2001**, *411*, 298.
- [161] Haygood, M. G.; Davidson, S. K. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1997**, *6*, 4612.
- [162] Velasco, A.; Acebo, P.; Gomez, A.; Schleissner, C.; Rodriguez, P.; Aparicio, T.; Conde, S.; Munoz, R.; de la Calle, F.; Garcia, J. L.; Sanchez-Puelles, J. M. *Mol. Microbiol.*, **2005**, *56*, 144.
- [163] Pospiech, A.; Cluzel, B.; Bietenhader, J.; Schupp, T. *Microbiology*, **1995**, *141*, 1793.
- [164] Corey, E. J.; Gin, D. Y.; Kania, R. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9202.
- [165] Endo, A.; Yanagisawa, A.; Abe, M.; Tohma, S.; Kan, T.; Fukuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6552.