



Anàlisi “ex vivo” de mecanismes d’inducció d’apoptosi i resistència al tractament en gliomes malignes

Ruth Villalonga Planells

ADVERTIMENT. La consulta d’aquesta tesi queda condicionada a l’acceptació de les següents condicions d’ús: La difusió d’aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d’investigació i docència. No s’autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d’un lloc aliè al servei TDX. No s’autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you’re accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it’s obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
Programa de Doctorat "Biomedicina"

Ruth Villalonga Planells

**Anàlisi "ex vivo" de mecanismes d'inducció d'apoptosi i
resistència al tractament en gliomes malignes**

DIRECTORES DE LA TESI:

Dra. Avelina TORTOSA I MORENO
Dra. Josefa GIMÉNEZ BONAFÉ

Data de lectura: 14 de setembre de 2011

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

1. Tumors glials: generalitats	3
1.1. Glioblastoma multiforme: incidència i característiques histològiques	5
1.2. Presentació clínica, diagnòstic i factors pronòstic del GBM.....	6
1.3. Biologia molecular dels gliomes	9
1.3.1. Via <i>EGFR/RAS/NF1/PTEN/AKT/Mtor</i>	10
1.3.2. Via <i>TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}</i>	13
1.3.3. Via <i>p16^{INK4a}/RB1/CDK4</i>	15
1.3.4. <i>IDH1/IDH2</i>	17
1.3.5. <i>MGMT</i>	19
1.3.6. Pèrdua d'heterozigositat	20
1.3.7. Pèrdua de 1p i 19q.....	20
2. Tractament dels pacients amb glioblastoma multiforme	21
2.1.- Cirurgia	22
2.2.- Radioteràpia.....	22
2.2.1 Mecanisme d'acció de la RDT: inducció de trencaments de doble cadena (DSB)	23
2.2.1.1 Senyalització de les DSB.	23
2.2.1.2 Regulació del punt de control de la fase G1/S.....	24
2.2.1.3 Regulació del punt de control de la fase G2/M	25
2.2.1.4 Activació del mecanisme d'apoptosi.....	26
2.2.1.5 Paper de la Histona H2AX.....	27
2.2.1.6 Reparació de la DSB	27
2.2.1.6.1 Mecanisme de reparació per unió d'extremes no homòlegs (NHEJ- Non Homologous End Joining).....	28
2.2.1.6.2 Mecanisme de reparació per recombinació homòloga	29
2.3. Quimioteràpia	30
2. 4. Resistència al tractament.....	32
2.4.1 Alteració del transport del fàrmac i disminució de la retenció cel·lular en gliomes....	32
2.4.2 Eficiència i capacitat de reparació del DNA i pèrdua de la capacitat d'activació de l'apoptosi en gliomes	33
2.4.3 Glioma stem cells o cèl·lules iniciadores de tumors (TIC)	35
3. Apoptosi i gliomes	35
3.1 Canvis morfològics i bioquímics durant l'apoptosi	36
3.2 Fases de l'apoptosi	37
3.3 Maquinaria efectora de l'apoptosi: les caspases.....	38
3.4 Vies de regulació de les caspases: IAPs.....	39
3.5 Vies d'activació de les caspases	41
3.5.1 Via extrínseca	41
3.5.2 Via intrínseca o mitocondrial	42
3.5.2.1 Reguladors de la via intrínseca: família de Bcl-2.....	43
3.6 Apoptosi en gliomes	44
3.6.1 Receptors de mort (DR, death receptors).....	44
3.6.2 Família BCL-2.....	45
3.6.3 Família IAPs.....	45
3.6.4 Altres estímuls inhibidors de l'apoptosi.....	46
4. Via de p53. Nutlines	46
4.1 Estructura i funció de p53.....	46
4.2 Regulació de p53 a través de l'interacció amb MDM2	47
4.3 Mecanisme d'estabilització i activació de p53	48
4.4 Diances moleculars de p53	49
4.5 Inhibició de la interacció entre p52 i MDM2: Nutlines	50

4.5.1 Introducció.....	50
4.5.2 Mecanisme d'acció.....	50
4.5.3 Nutlines i radioteràpia	52
5. Survivina	53
5.1 Estructura	53
5.2 Regulació de la Survivina	53
5.3 Funcions de la Survivina	53
5.4 Survivina i resistència al tractament.....	54
5.5 Petites molècules inhibidores de Survivina: YM155.....	55
6. Noves estratègies terapèutiques pels pacients amb glioblastoma.....	57

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultius cel·lulars.....	61
1.1 Recollida de mostres	61
1.2 Establiment de cultius primaris de glioma a partir d'una mostra tumoral	61
1.2.1 Establiment de cultius primaris amb sèrum.....	62
1.2.1.1 Establiment de cultius primaris a partir d'explants tissulars	62
1.2.1.2 Establiment de cultius primaris amb una disgregació amb l'enzim col·lagenasa.....	63
1.2.2 Establiment de cultius primaris amb medi stem	64
1.3 Línees cel·lulars de glioma	66
1.4. Criopreservació	68
1.4.1 Cultius primaris en medi amb sèrum i línies cel·lulars.....	68
1.4.2 Cultius primaris en medi stem	69
1.4.3 Descongelació	69
1.5 Tripsinització i manteniment dels cultius primaris i línies cel·lulars	69
1.6 Descongelació de Astròcits normals humans.....	70
1.7 Tripsinització i manteniment dels astròcits normals humans.....	70
1.8 Seguritat	71
2. Biologia cel·lular	71
2.1 Anàlisi de la viabilitat cel·lular i apoptosi.....	71
2.1.1 Assaig MTT	71
2.1.2 Anàlisi de l'apoptosi mitjançant la determinació de l'Anexina-V per citometria de flux.....	72
2.1.3 Assaig de formació de colònies	75
2.2 Anàlisi del cicle cel·lular	76
2.3 Anàlisi de senescència cel·lular	78
2.4 Separació de cultius primaris per al marcador CD133.....	80
2.5 Radioteràpia de línies cel·lulars	81
3. Citologia	81
3.1 Inmunitofluorescència	81
4. Biologia molecular	82
4.1 Anàlisi de DNA	82
4.1.1 Extracció de DNA.....	82
4.1.2 Quantificació del DNA	83
4.1.3 Seqüenciació de TP53.....	83
4.2 Anàlisi de RNA	86
4.2.1. Extracció de RNA	86
4.2.2. Mètode de RT-MLPA (Multiplex ligase-dependent probe analysis)	86
4.3. Anàlisi de proteïnes	89
4.3.1 Extracció de proteïna.....	89
4.3.2 Quantificació proteica	89

4.3.3 Western Blot	90
5. Vectors d'expressió gènica.....	94
5.1 Transfecció cel·lular per electroporació mitjançant l'ús del Nucleofector	94
5.1.1 Seqüència del siRNA de p53.....	95
5.2 Transformació bacteriana	95
5.3 Inoculació de colònies bacterianes recombinats a un medi de cultiu líquid.....	96
5.4 Extracció i purificació del plasmidi amb el insert d'interès. Maxi-prep	96
5.5 Vectors d'expressió	97
5.5.1 Plasmidis	97
6. Anàlisi de dades i estadística.....	98
OBJECTIUS	101
RESULTATS	105
Objectiu 1: Establiment de cultius primaris de gliomes a partir de mostres tumorals humanes	105
1.1 Introducció als cultius primaris	105
1.2 Característiques histològiques dels cultius primaris establerts	106
1.3 Establiment de cultius primaris amb sèrum	106
1.3.1 Obtenció d'explants.....	110
1.3.2 Manteniment cel·lular i criopreservació.....	110
1.3.3 Morfologia del cultius primaris	111
1.3.4 Disposició cel·lular dins la placa de cultiu	112
1.3.5 Caracterització dels cultius primaris : Inmunitofluorescència.	113
1.4 Cultius primaris de glioma sense sèrum	116
1.4.1 Establiment de cultius primaris de cèl·lules iniciadores de tumors (TIC).....	116
1.4.2 Manteniment cel·lular i criopreservació de cultius primaris de TIC	119
1.4.3 Diferenciació de TICs amb un medi amb sèrum	119
1.4.4 Separació de cèl·lules mare amb el marcador CD133+.....	120
1.5 Factors que limiten l'establiment de cultius primaris de glioma maligne.....	121
1.5.1 Factors limitant dependents de la mostra:	121
Objectiu 2: Tractament de línies cel·lulars i cultius primaris amb Nutlina-3a	123
2.1 Introducció	123
2.2 Efecte de la Nutlina-3a en el tractament de línies cel·lulars de glioma. Inducció de parada en el cicle cel·lular i apoptosi	123
2.3 Parada irreversible del cicle cel·lular i senescència en la línia cel·lular U87-MG després del tractament amb Nutlina-3a	129
2.4 El silenciament de p53 però no l'expressió ectòpica de la Survivina protegeix de la citotoxicitat induïda per Nutlina-3a en la línia cel·lular U87-MG.....	134
2.5 Radiosensibilització de cèl·lules de glioma amb p53 normal amb l'exposició a la Nutlina-3a	138
2.6 Efecte de la Nutlina-3a en el tractament de cultius primaris de glioblastoma. Inducció de parada en el cicle cel·lular, apoptosi i senescència.....	139
2.7 Determinació de la inducció d'apoptosi i anàlisi de l'expressió proteica en astròcits humans normals després del tractament amb Nutlina-3a	148
Objectiu 3. Tractament de línies cel·lulars de glioma i del cultiu primari 35/1506 amb YM155, un inhibidor de Survivina	150
3.1 Introducció	150
3.2 Efecte del YM155 en el tractament de línies cel·lulars de glioma	150
3.3 YM155 induïx una Inhibició de l'expressió de Survivina	152
3.4 YM155 induïx canvis morfològics en les línies cel·lulars de glioma	153
3.5 YM155 induïx apoptosi en les línies cel·lulars de glioma	155

3.6 YM155 indueix canvis en el patró de cicle cel·lular en línies de glioblastoma	157
3.7 YM155 provoca canvis en el perfil d'expressió de mRNA de gens implicats en l'apoptosi.....	159
3.8 Efecte de YM155 en combinació amb radioteràpia	160
3.9 La inhibició de Survivina amb l'exposició de YM155 provoca una disminució en la viabilitat cel·lular i inducció d'apoptosi en el cultiu primari 35/1506	163
3.10 L'exposició del cultiu primari 35/1506 al YM155, provoca una parada de cicle cel·lular	165
3.11 El tractament amb YM155 indueix canvis en el patró de mRNA de gens apoptòtics en el cultiu 35/1506	166
DISCUSSIÓ	171
CONCLUSIONS	187
BIBLIOGRAFIA	191
ANNEX I	211
ARTICLE	217