



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA

Bienni 1999-2001

Control de proteïnes reguladores de l'apoptosi en cèl·lules leucèmiques

**Aquesta Tesi ha estat realitzada sota la direcció de Dr. Gabriel Pons i Irazazábal
a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II
de la Universitat de Barcelona**

Dr. Gabriel Pons i Irazazábal.

Memòria presentada per **Daniel Iglesias i Serret**
Per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona



GABRIEL PONS I IRAZAZÁBAL
Professor Titular del Departament de Ciències Fisiològiques II

CERTIFICA: Que la Tesi Doctoral “Control de proteïnes reguladores de l’apoptosi en cèl·lules leucèmiques” que ha dirigit, i de la qual és autor DANIEL IGLESIAS I SERRET, està en condicions de ser presentada i defensada davant del Tribunal corresponent per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

I perquè consti, expedim aquest certificat.

L’Hospitalet de Llobregat, 24 de Març de 2005.

Dr. Gabriel Pons i Irazazábal.

*How I wish, how I wish you were here.
We're just two lost souls swimming in a fish bowl,
year after year,
running over the same old ground. What have we found?
The same old fears,
wish you were here.*

Wish You Were Here (Pink Floyd)

A la Neus

A la meva mare

Als meus amics

És difícil començar a escriure els agraïments, de fet ho he intentat diverses vegades i no me n'he sortit, i avui ja he escrit varies frases per començar...no pot ser que això sigui tan difícil!!!. Per què deu ser tant difícil escriure els agraïments? Potser és pel fet que és el que tothom mira primer a l'obrir una Tesi?. No crec que sigui aquest el motiu en el meu cas, de fet no m'importa gaire com quedaran al final els agraïments. El que m'importa realment és que la gent que és important per mi sàpiga el que vull expressar en aquesta part de la Tesi, el que sento per ells i l'important que són per mi.

Fa molt temps que va començar l'aventura de la Tesi, potser massa temps. És estrany quan miro enrera i veig al Daniel recent llicenciat en Biologia trucant de porta en porta buscant un lloc on fer la Tesi, ple d'il·lusions, empena i amb unes ganes boges de menjar-se el món. Tenia tantes ganes de fer recerca, tenia tantes ganes de treballar en la investigació del càncer, tenia tants somnis. A vegades penso que queda poc d'aquella personeta plena de somnis, però només a vegades ho penso.

Arribar fins aquí no ha estat un camí fàcil, almenys per mi. Els que em coneixeu bé, que no sou gaires, sabeu de què parlo. He passat moments de molta alegria i felicitat durant aquests cinc anys al laboratori, moments en què les coses anaven bé, moments en què si hagués pogut, hauria aturat el món, moments on els somnis eren realitat. Els que em coneixeu bé també sabeu, que hi ha hagut moments molt diferents, i més que moments han estat temporades. Ara no cal buscar culpables, i si n'hi ha, jo en sóc el principal. Tot el viscut en aquests anys m'ha canviat molt, crec, i estic segur que m'ha canviat a millor. De tot l'après, de tot el viscut, el millor sens dubte ha estat conèixer-vos. Només per això, ha valgut la pena. Vosaltres sou el millor somni que m'ha passat. Doncs allà vaig, a redactar amb paraules cada un dels meus somnis, cada un de vosaltres.

La primera persona que vaig veure a Bellvitge va ser en Biel, doncs tu seràs el primer. No m'és fàcil expressar el que sento, mai he estat bo en aquestes coses. Suposo que pels dos no ha estat una època fàcil, els dos hem passat per moments de canvi, que han fet que la mostra relació no hagi estat segurament tot el què s'espera entre un doctorant i un Director. Tant se val. Gràcies a tu escric aquests agraïments, gràcies a tu he pogut fer la tesi en aquest Departament, tu em vas triar. Gràcies per fer possible aquests somnis. Ens hem respectat, i això és important. Suposo que ens hem dit moltes coses sense parlar, tu ja ho saps. Gràcies.

A tu, Joan, per mostrar-me la passió i la il·lusió més desenfrenada per la ciència, i per tot el que no és ciència, per animar-me en tot moment i sobretot per confiar en mi. Sempre has estat pendent de mi. No saps l'important que ha estat això. Moltes gràcies.

Al Jose Manuel (l'home tranquil i feliç), per ajudar-me moltíssim en els meus inicis a Bellvitge, i sobretot per ser el meu amic, entendre'm i aguantar més d'un "sidral" (i no precisament científic)...a més, sempre ens quedarà Mcl-1!!

Ara toca les nenes del laboratori. Molt us haig d'agrair a totes. A l'Esther i la Maria P. per tot el que em va ajudar als inicis i encara ho feu, i perquè sempre he pogut comptar amb vosaltres, a nivell científic i a nivell personal, moltes gràcies. A la Montse, tot un "torbellino", sempre disposada a ajudar en qualsevol moment, ets increïble. He après moltes coses de tu, moltes tècniques, molta ciència, i sobretot molt com a persona, de debò. Has tingut molta paciència amb mi, gràcies. A la Clara, amb tu vaig començar aquesta aventura, i amb tu he compartit milers (o milions) de cigarrets a l'escala, on ens hem explicat la "vida", pel què ets una de les persones que més ha sabut de mi, i sempre has estat allà, sempre, gràcies. A l'Anna i la Mercè, que tot i que fa poc que hi sou, sembla molt, i això és perquè s'està molt a gust treballant amb vosaltres, i això ho és tot, gràcies.

A l'Antonio, per tot. Pel teu optimisme (moltíssimes vegades vital). Per tot el viscut al laboratori i sobretot fora del laboratori. Ets una de les persones més semblants a mi que m'he trobat, tu ja ho saps, en el bo i en el dolent (ja m'entens). M'has ajudat sempre, i sempre hi has estat quan t'he necessitat, moltes gràcies amic.

Al Llorenç, per tot. Ens hem entès a la perfecció. Gairebé aconseguim formar el "CRP", llàstima que no pugués ser!! Sempre has estat al meu costat, des dels inicis fins ara. Som com una parella de fet, sempre anem junts a tot arreu!! M'ha encantat que sigui així. Gràcies per sempre ser-hi.

A la Maria P.F., per ser la millor "ajudant" del món, per tot el que t'has implicat. M'has ajudat molt. Ets la primera noia que trobo que li agrada Pink Floyd, em pensava que no existien!! Gràcies per tot.

A tota la gent del laboratori 4165. A la Mercè O., per ser com ets, per valer un imperi!! M'ho he passat molt bé amb tu, i sempre has estat quan ha calgut, no canviïs mai. A l'Esther A., per tenir-ho tot sempre a punt (em refereixo a les coses del lab.), pels entrepans a la platja, i sobretot per les xerrades, sempre he pogut comptar amb tu. A l'Àurea, perquè sempre m'has escoltat i aconsellat, i perquè he connectat molt amb tu. A la Maria M., pel teu bon humor i simpatia; a l'Anna M., per donar-ho tot; al poeta del poble, el Joan D., la Marta i la Nieves, per tots els moments divertits, que han estat molts. Al Ramon, per preocupar-se tant per la gent del laboratori i perquè tot vagi bé, el resultat és envejable. Moltes gràcies a tots.

A la gent del laboratori 4171 i 4114. A l'Arnau, el Sabina català, per mostrar-me la teva millor part, perquè els dos en el fons sabem que "a la orilla de la chimenea" és molt millor que "peor para el Sol". A la Cristina Gamell., perquè amb el teu "bon dia Dani" fas que el dia sigui millor, no canviïs mai. Al policia del laboratori, el Francesc Viñals, per totes les xerrades i consells, que han estat molt importants, de debò. A la Raquel, tu em vas aconsellar que em quedés aquí. A la Roser i a la Bea, perquè amb la vostra simpatia feu que valgui la pena venir al laboratori. A la Júlia, per sempre preocupar-se de com van les coses. Al Francesc V., Santi, Jose Luís, Nelson, Antonio G., Francesc G., Pol, Cristina L, Cristina G., Eduard, Ouadah, Roser i Blanca. Gràcies a tots pels moments compartits.

A l'Edu, per ser el meu entrenador personal, la meva primera parella de fet, per ajudar-me en tot, per aguantar-me i sobretot per ser el meu amic. Va ser increïble viatjar a Mèxic amb tu, vas ser un gran company de viatge. Gràcies per tot.

A tota la gent de Biofísica i Fisiologia. Al Jose Carlos, per ensenyar-me la ciència i la vida des d'una nova perspectiva, i que de fet, m'agrada molt més. Al Jordi Bermúdez, que espero que algun dia em torni a fer un altre Roast beef, la Teresa R., Jordi B., Alícia, Anna V., Francesc, Roser, Jordi L. Pere, Pepita, Fina, Manel, Anna S., Judit, i Eduard B. (espero que et vagin les coses molt bé en el futur, de debò). Moltes gràcies a tots.

A tota la gent que ha passat pel laboratori i han fet que sigui millor. A la Cristina C., per sempre estar allà, escoltar-me i sobretot per preocupar-se tant i tant per mi, al Lluís i la Tere. Conèixer-vos ha estat del millor, no canviu mai. A la Diana, per les converses transcendents a altes hores de la matinada. A l'Elena, per la teva simpatia i alegria. A la Puri, l'Eli, l'Elaine, al Manolo i tota la resta de gent...gràcies a tots.

A la gent que ens hem anat veient de congrés en congrés, de seminari en seminari, o de Tesi en Tesi; a la Mireia D., l'Albert T., la Gisela, la Bea B., Sílvia M., Laura, Dolors C., Isabel F.,... compartint moments de ciència, i de no tanta ciència, que són els millors.

Als companys del final del passadís, al Benja, l'Alex, el Dani, l'Eli, i sobretot a la Marta, per fer més agradables els viatges de metro,...i tota la resta de gent. A tota la gent de l'Hospital, que fa agradable anar a recollir les mostres. A tota la gent del campus de Bellvitge, sobretot al grup de "seguratas", que et distreuen els dies de festa que et toca venir al laboratori. Moltes gràcies a tots.

A la Roser González, per deixar-me donar els primers passos en el món de la ciència al seu laboratori, i per fer-me sentir el seu recolzament cada cop que ens trobem.

A tota la gent del grup de Biologia, que heu fet que l'etapa universitària i la posterior siguin increïbles. A l'Albert, no cal que et digui gaire cosa, tu ja ho saps, sempre has estat al meu costat, i això no té preu, i sé que sempre hi seràs. Jo també hi seré. Ets molt important per mi. A la Natàlia, perquè sempre t'he trobat quan t'he necessitat, per totes les voll-damms de teràpia, i per tot. A la Raquel, per ser com ets tot i les bestieses que fas a vegades, i perquè sempre has estat al meu costat. A la Sandra per animar-me en tot moment, al Lluís i la Sus per fer-me "el padrino", Txell, Sònia i tota la resta de gent que els camins ens han fet separar. Moltes gràcies a tots, i no canvieu mai!!

A la Meri, per ser la meva amiga més..., per tots els moments, per confiar en mi, i per ser com ets. T'haig d'agrair moltes coses. A l'Aurora, perquè estar amb tu és fantàstic, i sé que sempre podré comptar amb tu pel que calgui. No canvieu mai cap de les dues, sou fantàstiques!!

Al grup de sempre. Són molts anys junts. Al Pini i la Mireia, per tot el que heu fet per mi, per sempre estar-hi i preocupar-se tant i tant per mi, ni la distància ens ha pogut separar, sou els millors!! Al Manuel, tot i ser com ets, sempre t'has preocupat i has fet molt per tots nosaltres, i això diu molt de tu. A l'Àlex, perquè espero que hi hagi un després d'ara. Al Roger i a la Meri, i a tota la gent de la comuna. Amb vosaltres em sento a casa. Gràcies per ser com sou.

Als cantaires de l'Orfeó Català, per més d'una cantarella que hem fet junts, perquè amb vosaltres m'hi sento molt bé i perquè sou gent de puta mare!!

A la meva família política (Lídia, Ferran, i la resta del "clan"...), per fer-me sentir un més.

Als meus avis, Manel, Mercè, Tomàs i Remei. M'ho heu donat tot. De vosaltres he après el millor. Tots heu estat uns veritables incondicionals meus. Per vosaltres he arribat fins aquí.

Al meu pare, Tomàs, per interessar-se sempre de "com van els negocis", i a la Maricel. Sempre heu intentat entendre el que faig, i no és fàcil. Moltes gràcies.

A la meva mare, Mercè. Durant tots aquests anys has estat constant en el teu esforç per donar-ho tot per mi, i de vegades sé que no ha estat fàcil. Ets sens dubte la persona que més ha fet perquè arribés fins aquí, i ara t'ho vull agrair públicament (perquè em sembla que no ho faig gaire sovint). La Tesi te la dedico. Et mereixes el millor. Moltes gràcies mare. Al Rafa, per tot el que fas, i perquè connecto molt amb tu. No canvieu mai cap dels dos. A la meva germana Sònia, per les tonteries que sempre fas i alguna pregunteta intel·ligent de tant en tant!!. Moltíssimes gràcies per aguantar-me.

A la Neus. Per canviar la meva vida, perquè no m'imagino res sense tu, per fer-me sentir com em fas sentir, per recolzar-me en tot, per entendre'm, per estimar-me com ho fas. Tu ja saps el que jo sento, només tu entens el meu silenci d'ara. Tu ets el millor de tots els somnis. Em fas sentir la persona més afortunada de l'Univers. Tu fas que tingui molt clar el que vull. El millor petitona encara està per arribar, el camí tot just ha començat, i durarà sempre.

Moltes gràcies a tots...i espero que ens seguim veient durant molts anys, per prendre voll-damms per aquí i per allà...escoltant bona música (a poder ser Pink Floyd, és clar...tot i que la música sempre es pot canviar, però no la cervesa, val??). Un petó a tots.

Daniel, Març del 2005.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1. L' APOPTOSI	1
1.1. EL PROCÉS D' APOPTOSI.....	1
1.2. CANVIS A LES CÈL·LULES DURANT L' APOPTOSI.....	2
1.3. LES FASES DE L' APOPTOSI.....	3
1.4. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L' APOPTOSI.....	4
1.5. LES CASPASES.....	6
1.6. LES DIFERENTS VIES D' APOPTOSI.....	8
1.6.1. Via extrínseca d' apoptosi o dels receptors de la mort.....	8
1.6.2. Via intrínseca d' apoptosi o via mitocondrial.....	9
1.6.3. Altres vies de mort: la via del reticle endoplasmàtic.....	11
1.6.4. Apoptosi independent de l' activació de les caspases.....	11
2. LA FAMÍLIA DE BCL-2	12
2.1. MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	13
2.2. LOCALITZACIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	13
2.3. INTERACCIÓ ENTRE ELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	15
2.4. FUNCIÓ DELS DIFERENTS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.....	16
2.4.1. Les proteïnes BH3-only com a sensors cel·lulars.....	16
2.4.2. Les proteïnes antiapoptòtiques: els protectors de la mort.....	18
2.4.3. Les proteïnes proapoptòtiques multidomini: els detonants de la mort.....	18
2.5. PAPER DE LA FAMÍLIA DE BCL-2 A L' ONCOGÈNESI.....	20
2.6. MCL-1.....	21
2.6.1. Estructura d' Mcl-1.....	21
2.6.2. Síntesi i degradació d' Mcl-1.....	23
2.6.3. Knock-out d' Mcl-1.....	25
2.6.4. Funcions biològiques d' Mcl-1.....	25
2.7. BIM.....	28
2.7.1. Estructura de BIM.....	28
2.7.2. Síntesi i degradació de BIM.....	29
2.7.3. Knock-out de BIM.....	31
2.7.4. Funcions biològiques de BIM.....	31
3. LA FAMÍLIA DE IAPs	32
3.1. Membres de la família de les IAPs.....	33
3.2. Funcions de les IAPs.....	34
3.3. Reguladors negatius de la funció de les IAPs.....	36
3.4. XIAP i la seva regulació traduccional.....	38

4. LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B	39
4.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B.....	39
4.1.1. Diagnòstic.....	40
4.1.2. Citogenètica i anormalitats oncogenètiques.....	41
4.1.3. Classificació dels estadis de la LLC-B i pronòstic.....	43
4.2. TRACTAMENT DE LA LLC-B.....	43
4.2.1. Tractament convencional.....	44
4.2.2. Problemes de la teràpia actual i nous tractaments.....	45
4.3. PRINCIPALS VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS IMPLICADES EN LA REGULACIÓ DE L'APOPTOSI I SUPERVIVÈNCIA DE LA LLC-B.....	47
4.3.1. Via de la PKC.....	48
4.3.2. Via de la PI3K/Akt.....	48
4.3.3. Via de la MAPK.....	49
4.3.4. Via de JAK/STAT.....	49
4.3.5. La via de NF- κ B.....	50
4.3.6. La via de p53/ATM.....	50
4.3.7. Quinases regulades per nucleòtids.....	52
4.3.8. Quinases dependents de ciclins (Cdks).....	53

OBJECTIUS **55**

RESULTATS I DISCUSSIÓ **56**

ESTUDI DE LA REGULACIÓ D'MCL-1 EN LES CÈL·LULES JURKAT **57**

Regulació transcripcional i traduccional d'Mcl-1 en l'apoptosi induïda per aspirina i estaurosporina a la línia cel·lular jurkat.

ANÀLISI D'INSERCIIONS AL PROMOTOR D'MCL-1 EN CÈL·LULES DE LLC-B **81**

Anàlisi d'insercions en el promotor de Mcl-1.

ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE BIM EN CÈL·LULES DE LLC-B **87**

Regulació de BIM en cultius primaris de LLC-B per diferents factors inductors de supervivència i durant l'apoptosi induïda per glucocorticoids.

<u>CONCLUSIONS</u>	<u>111</u>
<u>ALTRES RESULTATS: EL PROMOTOR D'XIAP</u>	<u>113</u>
<u>MATERIALS I MÈTODES</u>	<u>129</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>155</u>
<u>ABREVIACIONS</u>	<u>173</u>
<u>PUBLICACIONS</u>	<u>175</u>

INTRODUCCIÓ

1. L' APOPTOSI.

1.1. EL PROCÉS D' APOPTOSI.

El procés de mort cel·lular programada va ser anomenat per primer cop amb el terme apoptosi per Kerr, Wyllie i Currie l'any 1972. Es va descriure com el procés fisiològic de mort cel·lular pel qual les cèl·lules velles, ectòpiques, malmeses o potencialment perilloses són eliminades de manera controlada (Kerr et al., 1972). És un procés fonamental perquè es dugui a terme un correcte desenvolupament embrionari i un correcte manteniment de l'homeòstasi dels teixits en els organismes pluricel·lulars, participant en el recanvi cel·lular o en la metamorfosi d'alguns organismes.

Aquesta via de mort cel·lular programada està conservada evolutivament i respon, tant a estímuls fisiològics, com a agressions externes patològiques. Així, una desregulació del procés d'apoptosi, ja sigui per dèficit o per excés, pot ser catastròfica, desencadenant un gran nombre de patologies. A la Taula-I1 trobem algunes de les patologies associades a la desregulació del procés d'apoptosi. Una resistència de les cèl·lules a l'apoptosi permet la persistència de cèl·lules autoreactives o mutades, que poden provocar diferents desordres com el càncer o l'autoimmunitat. En canvi, en les situacions on hi ha un excés d'apoptosi, es produeixen diferents patologies, com l'isquèmia o l'infart, així com també patologies cròniques com les malalties neurodegeneratives o la SIDA.

MALALTIES PER DÈFICIT D' APOPTOSI	MALALTIES PER EXCÉS D' APOPTOSI
Càncer Leucèmia Limfàtica Crònica Malalties autoimmunes Lupus eritromatós Glomerulonefritis Diabetis Infeccions virals Herpes Poxvirus Adenovirus	Immunodeficiències SIDA Malalties neurodegeneratives cròniques Alzheimer, Parkinson, Esclerosi lateral amiotròfica, Retinitis pigmentosa, Degeneració cerebelar Síndromes mielodisplàsiques Aplàsia medul·lar Malalties degeneratives agudes Dany isquèmic, Infart de miocardi, Dany de reperfusió, Accident vascular cerebral, Hepatitis induïda per tòxics (alcohol), Pancreatitis, Tiroïditis

TAULA-I1. Malalties associades a la desregulació de l'apoptosi (modificat de Thompson, 1995).

L'apoptosi és un procés molt important pel desenvolupament i correcte funcionament del sistema immune. Durant la diferenciació, mitjançant l'apoptosi, són eliminats els limfòcits que no són funcionals o són autoreactius, i es limita la durada de la resposta immune enfront a les infeccions. Es requereix una estricta regulació en la supervivència dels leucòcits per tal de mantenir l'homeòstasi i el funcionament normal del sistema immune (Marsden i Strasser, 2003).

1.2. CANVIS A LES CÈL·LULES DURANT L'APOPTOSI.

Durant el procés d'apoptosi a la cèl·lula es produeixen una sèrie de canvis, tant morfològics com bioquímics:

Canvis morfològics.

Les cèl·lules apoptòtiques manifesten una morfologia cel·lular alterada. Les cèl·lules presenten una condensació del citoplasma i del nucli, es fan més petites i apareixen unes protusions a la membrana, anomenades *blebs*. A mesura que avança el procés, la cromatina es condensa, els nuclèols es desintegren i es redueix la mida del nucli. Es redueix també el volum total de la cèl·lula, alhora que es fa més densa per la condensació dels orgànuls, mentre que el reticle endoplasmàtic es dilata. Els mitocondris es mantenen morfològicament intactes. Durant les etapes finals de l'apoptosi, nucli i citoplasma es fragmenten i s'encapsulen en vesícules envoltades de membrana, formant els cossos apoptòtics (Figura-I1).

Canvis bioquímics.

Les cèl·lules que entren en apoptosi, paral·lelament als canvis morfològics, pateixen una sèrie de canvis a nivell bioquímic. Hi ha una degradació del DNA genòmic en fragments internucleosomals múltiples de 180 pb (parells de bases) (Wyllie, et al., 1980), una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i de l'asimetria en la composició de la membrana plasmàtica. Durant l'apoptosi els fosfolípids de fosfatidil serina, que habitualment es troben de manera exclusiva a la bicapa lipídica interna de la cèl·lula, queden exposats també a la bicapa externa (Fadock et al., 1992). Aquest procés culmina amb el reconeixement i fagocitosi dels cossos apoptòtics pels macròfags. El fet que la membrana plasmàtica es mantingui íntegra durant tot el procés d'apoptosi és de vital importància pels organismes, ja que d'aquesta manera s'evita l'abocament del material cel·lular a l'espai intercel·lular, que provocaria una reacció inflamatòria (Savill i Fadock, 2000) (Figura-I1).

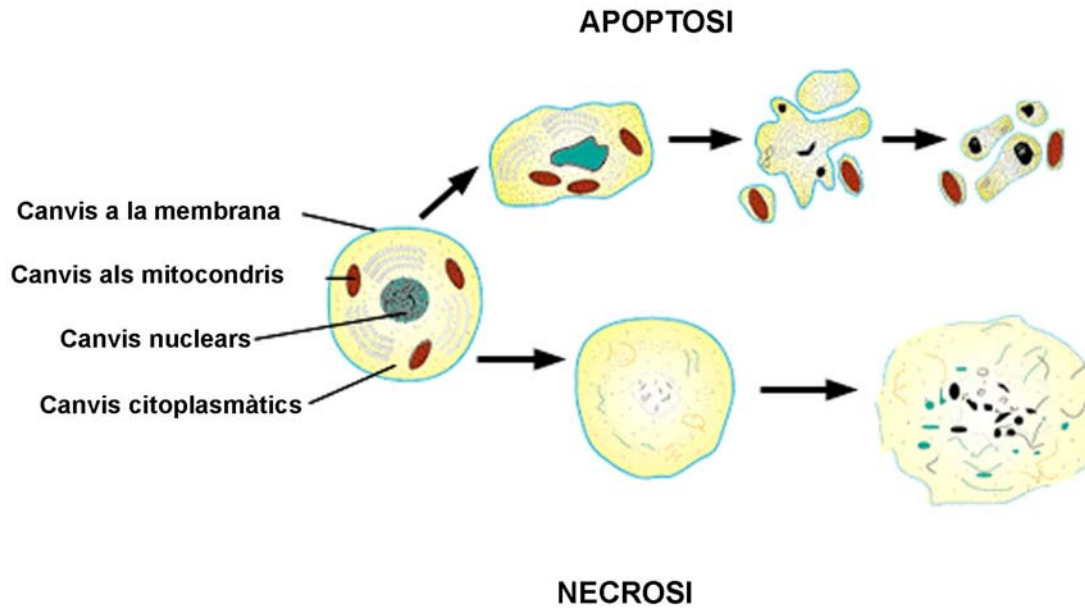


FIGURA-11 Diferències en la morfologia de les cèl·lules apoptòtiques i necròtiques (modificada de la Tesi Doctoral de Montserrat Barragán, 2002).

1.3. LES FASES DE L'APOPTOSI.

L'apoptosi és un procés altament regulat, ja que qualsevol desregulació que comporti l'activació del procés condueix la cèl·lula a la mort. Quan es produeix un estímul apoptòtic, de la naturalesa que sigui, fisiològic o induït per estímuls externs, les cèl·lules activen la maquinària encarregada de desencadenar el procés.

El procés d'apoptosi es pot dividir en tres fases:

1.-Fase iniciadora.

Els factors inductors d'apoptosi entren en contacte amb la cèl·lula, i depenent de la naturalesa de cada estímul, desencadenen diferents respostes intracel·lulars que transmeten el senyal a la maquinària apoptòtica mitjançant canvis en la seva expressió o estat d'activació. S'han definit tres mecanismes d'iniciació de l'apoptosi: els receptors de mort, l'acció de cèl·lules T citotòxiques i el dany cel·lular (estrès, radiació, etc.).

2-Fase executora.

Un cop s'han integrat els estímuls, existeix un punt, a partir del qual, el procés és irreversible, i la cèl·lula pren la decisió de morir. Aquest punt de no retorn es dona quan s'activen en forma de cascada les caspases (proteases encarregades de l'execució del procés d'apoptosi mitjançant la degradació de diferents substrats cel·lulars). Aquest és el punt de convergència de gairebé tots els senyals inductors d'apoptosi.

3-Fase de destrucció.

En aquesta fase, quan tota la maquinària efectora de la mort ja està activada, la cèl·lula perd la seva integritat i presenta la morfologia i els canvis bioquímics típics de l'apoptosi.

1.4. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'APOPTOSI.

L'apoptosi, com altres processos cel·lulars vitals per la supervivència dels organismes, és un procés molt conservat evolutivament. Aquest procés s'ha estudiat als principals organismes models utilitzats en recerca, des dels més senzills, com el nemàtode *C. elegans* i la mosca *Drosophila*, acabant en els cultius cel·lulars de mamífer, on en cada un d'ells s'ha focalitzat l'estudi en les diferents parts del mecanisme de mort cel·lular, el què ens ha permès entendre els diferents punts de control del procés.

Els primers estudis: el model de *C. elegans*.

Un dels models més utilitzats per l'estudi del mecanisme d'apoptosi és el del nemàtode *C. elegans*, un organisme pluricel·lular molt senzill que conté 14 gens implicats en el procés de mort cel·lular. Durant el desenvolupament de *C. elegans* moren, de forma invariable, 131 de les 1090 cèl·lules inicials, de manera que el nemàtode adult conté 959 cèl·lules. Sydney Brenner fou pioner en la utilització d'aquest nemàtode com a model per l'estudi de l'apoptosi, i el primer en veure que era l'organisme ideal per definir i estudiar els gens responsables del control del destí cel·lular (Brenner, 1974). No gaire més tard, John Sulston va descriure de forma exacta les cèl·lules que s'indueïen a morir durant el desenvolupament del nemàtode (Sulston, 1976) i H. Robert Horvitz realitzà els estudis de mutagènesi que van portar a la identificació dels gens que regulen la mort d'aquestes 131 cèl·lules del nemàtode (Ellis i Horvitz, 1986). Aquests tres científics, pels seus estudis pioners en genètica del desenvolupament i

mort cel·lular, van rebre el Premi Nobel de Medicina l'any 2002. Els estudis inicials van descriure els gens *ced-3* i *ced-4* (de *cell death proteins*) com a essencials per la correcta execució del programa apoptòtic (Ellis i Horvitz, 1986). El grup de Horvitz va veure que la mutació del gen *ced-3*, que codificava una proteïna altament homòloga a una proteïna de mamífers, la proteasa ICE (de *IL-1 β converting enzyme*), ocasionava un dèficit d'apoptosi durant el desenvolupament. Més tard, es va descriure un altre gen necessari per revertir l'apoptosi, *ced-9*, que va ser identificat per una mutació de guany de funció, que produïa un dominant capaç de bloquejar la mort de les cèl·lules somàtiques (Hengartner i Horvitz, 1994). En condicions no apoptòtiques, CED-9 es troba inhibint CED-3 i CED-4, però en resposta a un estímul apoptòtic s'indueix l'expressió d'una proteïna anomenada EGL-1, que actua dissociant CED-9 de CED-4, possibilitant l'activació CED-3.

Homologia entre espècies.

Els estudis realitzats en aquest model han permès definir les característiques de l'apoptosi i demostrar que aquest procés depèn de la interacció directa entre proteïnes reguladores i proteïnes efectores. El primer homòleg de les proteïnes CED trobat en animals vertebrats va ser Bcl-2 (Tsujiimoto et al., 1984a), que és estructuralment i funcionalment similar a CED-9, i per tant regulador negatiu del procés apoptòtic (Hengartner i Horvitz, 1994). Actualment, cadascun dels gens *ced* i *egl* de *C. elegans* tenen com a mínim un homòleg funcional a mamífers; l'homòleg de CED-3 a mamífers són les caspases, n'hi ha 14 membres; el de CED-4 és Apaf-1; el de CED-9 són els membres de la família de Bcl-2; i el de EGL-1 són els membres BH3-only de la família de Bcl-2.

El gens que controlen el mecanisme de mort al nemàtode són, funcional i estructuralment, semblants als seus homòlegs de vertebrats, fins al punt que el gen Bcl-2 de mamífer és funcional en *C. elegans*, inhibint l'apoptosi (Hengartner i Horvitz, 1994), el que demostra clarament la conservació d'aquesta via de mort cel·lular al llarg de l'evolució.

1.5. LES CASPASES.

El grup de Yuan va demostrar que ICE, la proteasa que promovia la inflamació al processar la IL-1 β i que va ser relacionada inicialment amb CED-3, activada artificialment era capaç d'induir la mort cel·lular. Ara se sap que ICE no està involucrada en processos d'apoptosi. Aquests descobriments van iniciar la recerca dels membres de la família de proteases relacionades amb ICE, que avui dia coneixem com la família de les caspases (de cysteine-aspartate-proteases), nomenclatura acordada al 1996, i enumerades segons l'ordre cronològic de clonatge. S'han identificat 14 caspases a mamífers (11 caspases en humans, i les caspases 11, 12 i 14 només en ratolí), 6 caspases a *Drosophila* i 6 a *C. elegans*. Els membres de la família de caspases a mamífers es classifiquen en tres grups, que es presenten en la Taula-12, segons la seva funció a les rutes apoptòtiques, l'homologia de seqüència i l'especificitat de substrat (Salvesen i Dixit, 1997; Nicholson i Thornberry, 1997; Thornberry i Lazebnik, 1988).

L'activació de les caspases.

Les caspases són cistein proteases que poden ser processades en posicions situades després de residus d'aspàrtic (Thornberry i Lazebnik, 1998). L'activació de les caspases és un fenomen altament regulat, per evitar que la cèl·lula entri en apoptosi de manera inespecífica. Per tal de regular l'activació de les caspases, aquestes són expressades en forma de zimògens, que són formes precursoras inactives.

- Les caspases-iniciadores (com la caspasa 8 o 9) són les primeres en activar-se després de rebre l'estímul apoptòtic. Es caracteritzen, a diferència de les caspases-executores, per tenir un llarg prodomini a la part amino-terminal. L'activació d'aquestes es dona per la dimerització de les formes zimògenes mitjançant l'ajut de proteïnes adaptadores.
- Abans que les caspases-executores (caspasa 3, 6 i 7) puguin atacar els seus substrats cel·lulars, les seves formes precursoras inactives han de ser proteolíticament clivellades per una de les caspases-iniciadores.

Un altre nivell de regulació de les caspases és el que fan les proteïnes de la família de les IAPs, de les quals en parlarem més endavant, que són capaces d'unir-se a les caspases i evitar la seva activació.

Substrats de les caspases.

Les caspases-executores, un cop s'han activat, proteolitzen proteïnes essencials per la integritat de la cèl·lula. Aquesta proteòlisi no és indiscriminada, i es fa sobre substrats específics. S'han identificat més de 280 proteïnes que són substrat de les caspases que participen, entre altres funcions: a la replicació del DNA com el factor de replicació C; transcripció i *splicing* com l'U1-70K; reparació del DNA com la PARP (de *poly(ADP)ribose polymerase*) i la DNA-PK; proteïnes del citoesquelet com la FAK (de *focal adhesion kinase*) i la PAK2 (de *p21-activated kinase 2*); proteïnes d'estructures nuclears com les lamines; i proteïnes inhibidores de l'apoptosi com l'ICAD, que inhibeix l'activació de la DNasa CAD, per destacar-ne algunes (Hengartner, 2000; Fischer et al., 2003). Algunes de les proteïnes de la família de Bcl-2, com són Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, Bad, Bib, i de les IAPs, com XIAP i c-IAP-1, que regulen el procés d'apoptosi, també són substrat de les caspases.

Caspases de mamífer	Altres noms	Funció	Especificitat
CASPASES NO IMPLICADES EN APOPTOSI			
Caspasa-1	ICE	Inflamació	(WL)EHD
Caspasa-4	ICE _{neII} , TX, ICH-2		(WL)EHD
Caspasa-5	ICE _{neIII} , TY		(WL)EHD
Caspasa-11		Inflamació	
Caspasa-13			
Caspasa-14			
CASPASES INICIADORES		Especificitat de substrat	
Caspasa-2	Nedd2, ICH-1	DEXD	
Caspasa-8			
Caspasa-9	ICE-LAP6, Mch6	(IVL)EXD	
Caspasa-10	Mch4, FLICE-2		
Caspasa-12			
CASPASES EFECTORES			
Caspasa-2	Nedd2, ICH-1		
Caspasa-3	CPP32, Yama, Apopain	DEXD	
Caspasa-6	Mch-2	(IVL)EXD	
Caspasa-7	Mch-3, ICE-LAP3, CMH-1	DEXD	
Caspasa-8	FLICE, MACH, Mch5	(IVL)EXD	

TAULA-I2. Classificació de les caspases en tres grups, segons la seva funció a les rutes apoptòtiques, l'homologia de seqüència i l'especificitat de substrat (modificat de Salvesen i Dixit, 1997; Nicholson i Thornberry, 1997; Thornberry i Lazebnik, 1988).

1.6. LES DIFERENTS VIES D'APOPTOSI.

En mamífers s'han descrit dues vies principals d'apoptosi, que requereixen diferents caspases-iniciadores, però que convergeixen a nivell de les caspases-efectores activades. Una és la disparada per l'activació dels receptors de superfície anomenats "receptors de la mort" (Strasser et al., 2000; Ashkenazi, 2002) i l'altra, és la induïda per diferents situacions d'estrès cel·lular, com una inadequada aportació de citocines o dany intracel·lular, que induirà la sortida de factors apoptòtics de dins del mitochondri, i on tenen molta importància els membres de la família de Bcl-2, que són anomenats "els guardians de la integritat mitocondrial" (Green i Reed, 1998; Cory i Adams, 2002).

1.6.1. Via extrínseca d'apoptosi o dels receptors de la mort.

La via dels receptors de la mort, o via extrínseca d'apoptosi, s'inicia per la unió de lligands de la superfamília del factor de necrosi tumoral (TNF), com TNF α , CD95L/FasL, TWEAK i TRAIL, als seus receptors de la superfície cel·lular (TNFR, CD95/Fas, DR3/Apo2 i DR4/5 respectivament). La unió d'aquests lligands indueix l'agregació i activació dels receptors. La via apoptòtica desencadenada per l'activació dels receptors de la mort, provoca la formació del complex de senyalització inductor de mort, anomenat DISC (de *death-inducing signaling complex*). Aquest complex DISC està format per la unió de les proteïnes adaptadores FADD (de *Fas-associated death domain*) i TRADD (de *TNFR1-associated death domain protein*) mitjançant el seu domini de mort, DD (de *death domain*), als DD de la regió citoplasmàtica dels receptors. Mitjançant interaccions homotípiques dels dominis efectors de mort, DED (de *death effector domain*), les proteïnes adaptadores provoquen el reclutament i activació de la caspasa-8 (i també la caspasa 10 en humans) (Marsden i Strasser, 2003). La proximitat dels zimògens provoca la seva dimerització i subseqüent autocatàlisi. Un cop s'ha activat la caspasa-8, s'activen les caspases-efectores (Figura-I2).

La senyalització a través dels receptors de la mort pot ser inhibida per les proteïnes cel·lulars i virals anomenades FLIPs (de *FLICE-inhibitori proteins*), que són molècules semblants a la caspasa-8 o a dos dominis DED on es perd el lloc actiu, que és un residu crític per la seva funció; les FLIPs, de les quals s'han descrit dues isoformes, FLIP_L i FLIP_S, són reclutades al complex DISC i eviten l'activació i l'alliberament de la caspasa-8. Aquestes FLIPs no tenen cap efecte en l'apoptosi induïda per la retirada de citocines o altres estímuls inductors d'apoptosi per la via intrínseca. Als limfòcits i a les

cèl·lules mieloides, la via d'apoptosi induïda pels receptors de la mort no està controlada pels membres de la família de Bcl-2 (Marsden i Strasser, 2003). Als limfòcits B hi ha un augment dels nivells de FLIP presents al DISC en resposta a l'estimulació de CD40 i BCR (Hennino et al., 2001; Wang et al., 2000), i a les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica de tipus-B, l'expressió de FLIP_L augmenta per lligació de CD40 (Kitada et al., 1999).

1.6.2. Via intrínseca d'apoptosi o via mitocondrial.

La via mitocondrial d'apoptosi, o via intrínseca, es desencadena en resposta a una gran varietat de situacions d'estrès, tant internes com externes, com poden ser la retirada de factors del medi, agents tòxics, dany al DNA, radiacions, agents oxidants o activació d'oncogens, entre d'altres. En l'apoptosi activada per les diferents situacions d'estrès es modifiquen diversos components cel·lulars, que actuen com a sensors del dany o alteració i inicien la cascada apoptòtica, induint la perforació de la membrana mitocondrial externa i afavorint l'alliberament del citocrom-c i altres molècules proapoptòtiques de dins el mitocondri. El citocrom-c, component fonamental de la fosforilació oxidativa i de la formació d'ATP, un cop al citoplasma, s'unirà als dominis autoinhibitoris (dominis WD) de la proteïna Apaf-1, (de *apoptotic protease activating factor*) activant-la i provocant-li un canvi conformacional que fa que oligomeritzi de forma depenent d'ATP, possibilitant així el reclutament i l'activació del proenzim de la caspasa-9, via el domini homòleg de reclutament CARD (de *caspase recruitment domain*). El resultat de la interacció de les tres proteïnes, és la formació d'un complex heptamèric de gran mida (d'aproximadament 1 megadalton), anomenat apoptosoma, on la caspasa-9 s'activa per canvis alostèrics i per dimerització (Acehan et al., 2002; Rodriguez i Lazebnik, 1999). Un cop activada la caspasa-9, aquesta processa les caspases-3 i -7, que inicien la proteòlisi dels diferents substrats cel·lulars. Les cèl·lules deficientes en citocrom-c (Li et al., 2000), Apaf-1 (Yoshida et al., 1998) o caspasa-9 (Kuida et al., 1998), presenten defectes en l'apoptosi en resposta a senyals interns. Fins ara tots els processos apoptòtics induïts per estrès eren atribuïts a l'activació de la caspasa-9, però avui en dia, es coneix que altres caspases iniciadores poden participar-hi. Els membres de la família de Bcl-2, dels quals en parlarem amb més detall més endavant, són els encarregats de controlar aquesta via de mort (Figura-12).

L'apoptosi desencadenada per l'activació dels receptors de la mort, i la via mitocondrial controlada pels membres de la família de Bcl-2, poden estar connectades a través del membre proapoptòtic Bid (Li et al., 1998b; Danial i Korsmeyer, 2004), que pertany

INTRODUCCIÓ

al subgrup BH3-only, dins de la gran família de Bcl-2. La inducció de la via extrínseca de mort indueix l'activació de la caspasa-8, que és capaç de proteolitzar a Bid, generant una forma truncada (tBid), que pot translocar al mitocondri i induir la sortida del citocrom-c, amplificant la cascada apoptòtica.

Les cèl·lules es poden classificar segons les vies apoptòtiques activades en l'estimulació dels receptors de la mort. En les cèl·lules de tipus I, el processament de la caspasa-8 és suficient per activar la cascada de caspases i desencadenar el procés de mort, independentment de la via mitocondrial i dels membres de la família de Bcl-2. En les cèl·lules tipus II, l'activació de les caspases-efectores depèn de la translocació de Bid al mitocondri i de l'activació de la via intrínseca.

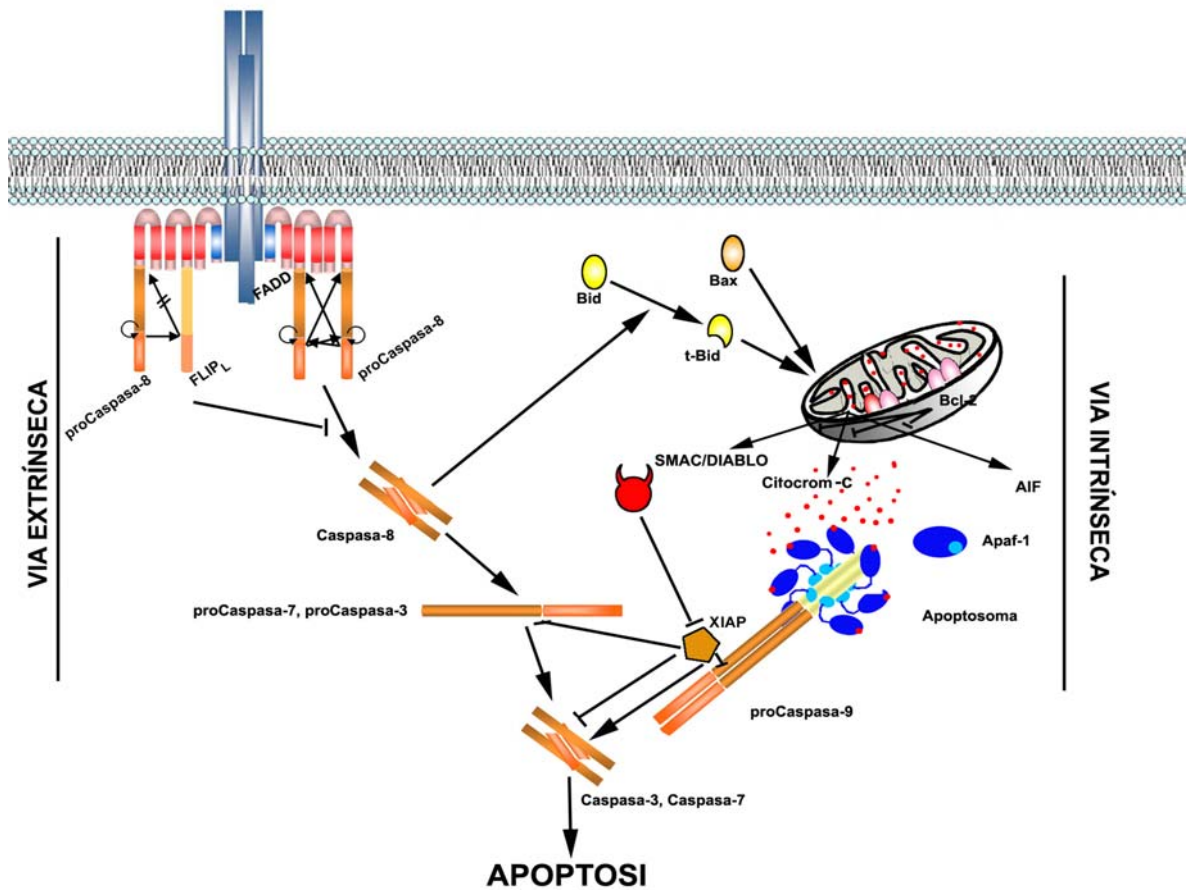


FIGURA-12. Esquema de la via extrínseca i de la via intrínseca d'apoptosi. Es pot veure la connexió entre les dues vies a través del processament de la proteïna Bid (Modificat de la Tesi Doctoral de Montserrat Barragán, 2002).

1.6.3. Altres vies de mort: la via del reticle endoplàsmic.

A la cèl·lula hi ha altres orgànuls, a més del mitocondri, capaços d'integrar els senyals de mort, com el reticle endoplàsmic, l'embolcall nuclear, els lisosomes i l'aparell de Golgi. Aquests orgànuls tenen sensors per detectar alteracions específiques que induiran diferents senyals per permeabilitzar la membrana mitocondrial o activar les caspases, per tal d'amplificar el procés d'apoptosi (Ferri i Kroemer, 2001). Cada vegada més, s'està implicant el reticle endoplàsmic com un orgànul important en el control de l'apoptosi. En la seva membrana s'han trobat tant membres antiapoptòtics com proapoptòtics de la família de Bcl-2. Les diferents situacions d'estrès al reticle indueixen canvis conformacionals i l'oligomerització dels membres Bax i/o Bak, i l'activació de la caspasa-12 (Zong et al., 2003). Una alteració a la funcionalitat del reticle endoplàsmic o un mal plegament de proteïnes, o bé si aquest és insuficient, fa que s'iniciï una resposta d'estrès per intentar reparar la disfunció. Si aquesta no és restaurada i el dany és irreparable, s'iniciarà el procés apoptòtic. També, la mobilització dels dipòsits de calci poden sensibilitzar els mitocondris als senyals apoptòtics (Brekenridge et al., 2003).

Els últims descobriments sobre l'activació i control de les caspases han fet variar alguns dels axiomes que es creien inamovibles, ja que s'han trobat casos d'apoptosi induïda per estrès o induïda pels receptors de la mort, on les caspases poden ser activades per damunt, o independentment del mitocondri. Per tant, la pertorbació del mitocondri, podria ser en alguns casos, només el cop de gràcia necessari per destruir una cèl·lula que ja té determinat el seu destí en la via de la mort cel·lular (Cory et al., 2003).

1.6.4. Apoptosi independent de l'activació de les caspases.

En el nemàtode *C. elegans* s'ha demostrat que la caspasa CED-3 és indispensable per l'apoptosi. Tot i això alguns autors han suggerit que en mamífers, alguns tipus d'apoptosi poden tenir lloc sense l'activació de caspases. Aquests estudis s'han dut a terme principalment mitjançant l'ús d'inhibidors químics de les caspases. La inducció d'apoptosi en la seva presència reflecteix més que res la ineficàcia d'aquests compostos, particularment *in vivo* (Nicholson, 1999). No obstant, s'han identificat dos factors que poden ser mediadors potencials d'alguns tipus d'apoptosi sense la necessitat d'activació de les caspases. Aquests factors són AIF (de *apoptosis-inducing factor*) (Susin et al., 1999) i l'endonucleasa-G (Li et al., 2001). Sembla que els dos

factors són capaços d'induir els canvis apoptòtics en el nucli, com és la fragmentació del DNA, però cap dels dos és capaç d'induir la resta de canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi. No està molt clara la importància d'aquests dos factors en el procés d'apoptosi.

2. LA FAMÍLIA DE BCL-2.

El fet que una cèl·lula hagi de morir o sobreviure està determinat en part per la família de proteïnes de Bcl-2, que conté tant proteïnes antiapoptòtiques com proapoptòtiques. Aquests reguladors de l'apoptosi responen a estímuls cel·lulars molt variats, ja siguin diferents condicions d'estrès cel·lular, dany al DNA o la pèrdua de citocines i factors de creixement de l'entorn cel·lular, per posar alguns exemples. Els membres antiapoptòtics i proapoptòtics d'aquesta família interaccionen els uns amb els altres, afectant l'organització estructural de diferents orgànuls cel·lulars, per determinar si s'ha de desencadenar la cascada proteolítica de caspases que conduirà la cèl·lula a la mort. Els diferents membres de la família també poden afectar la regulació del cicle cel·lular, i per tant al desenvolupament dels tumors, funcionant com a gens supressors de tumors o com oncoproteïnes.

La identificació del gen *ced-9* en el nemàtode *C. elegans* va ser el punt de partida del que una dècada més tard seria la família de Bcl-2. El primer gen descobert de la família, el que li dóna el nom, va ser *bcl-2*, aïllat en la translocació cromosòmica t(14;18) en pacients de limfoma folicular, que porta el gen sota control del *locus* de la cadena pesada de les immunoglobulines (Tsukimoto et al., 1984a). A diferència d'altres oncogens identificats, es va veure que Bcl-2 era capaç de promoure la supervivència cel·lular més que induir-ne la proliferació (Vaux et al., 1988). Actualment sabem, que la família de Bcl-2 està formada d'almenys 20 membres, que comparteixen uns dominis homòlegs anomenats BH (de *Bcl-2* *homology*), que permeten als diferents membres interaccionar entre ells, per tal d'integrar els diferents senyals cel·lulars que han d'activar l'apoptosi o les vies de supervivència (Cory i Adams, 2002) (Figura-13).

2.1. MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.

Membres antiapoptòtics.

Bcl-2 és el membre més representatiu d'aquest grup. Juntament amb els membres més semblants estructuralment, Bcl-X_L, Bcl-W i Boo/Diva/Bcl-B, i els membres més divergents, Mcl-1 i A1/Bfl-1, protegeixen a les cèl·lules d'un ampli ventall d'agressions citotòxiques, com són la deprivació de citocines, la radiació UV o γ , o drogues quimioterapèutiques. Tots ells contenen tres o quatre dominis BH. Els dominis BH1, BH2 i BH3 formen una butxaca hidrofòbica que permet la interacció amb el domini BH3 dels membres proapoptòtics.

Membres proapoptòtics multidomini.

Dintre d'aquest grup hi trobem Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-G_L i Bcl-X_S (variant d'*splicing* del gen *bcl-x*), que són molt similars a Bcl-2 en quant a estructura i seqüència, conservant dos o tres dominis BH (BH1, 2 i 3). Quan s'activen, actuen pertorbant les membranes intracel·lulars.

Membres proapoptòtics amb només el domini BH3 (BH3-only).

Aquests grup de membres proapoptòtics tenen una seqüència més divergent als altres membres de la família de Bcl-2, excepte en el manteniment del domini BH3 (pel que són anomenats "BH3-only") com a tret diferencial, que sembla indispensable per la seva funció apoptòtica. Dins d'aquest grup s'inclouen Bad, Bid, Bim/Bod, Bcl-G_S (variant d'*splicing* del gen *bcl-g*), Bik/Nbk/Blk, Bnip3/Nix, NIP3, Bmf, Hrk/DP5, Noxa i PUMA/Bdc3.

2.2. LOCALITZACIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.

La majoria dels membres antiapoptòtics (com Bcl-2) i proapoptòtics multidomini (com Bax), i alguns dels BH3-only, a l'extrem carboxi-terminal de les seves proteïnes es troba una seqüència hidrofòbica de 16-19 residus, que és un domini transmembrana (TM), important pel seu direccionament cap a diferents membranes intracel·lulars. Estudis de localització en cèl·lules sanes col·loquen a Bcl-2 a les membranes del mitocondri, de l'embolcall nuclear i del reticle endoplàsmic, a Bcl-X_L i Bcl-W principalment al mitocondri (Monaghan et al., 1992; Krajewski et al., 1993; Lithgow et al., 1994), mentre que els altres membres se solen trobar a la fracció citosòlica (Hsu et al., 1997; Hausmann et al., 2000). Els membres proapoptòtics també difereixen en la

seva localització; Bak es troba associat a les membranes del reticle endoplàsmic i del mitocondri, i Bax sembla ser majoritàriament citosòlic (Wolter et al., 1997; Hsu i Youle, 1998; Griffiths et al, 1999).

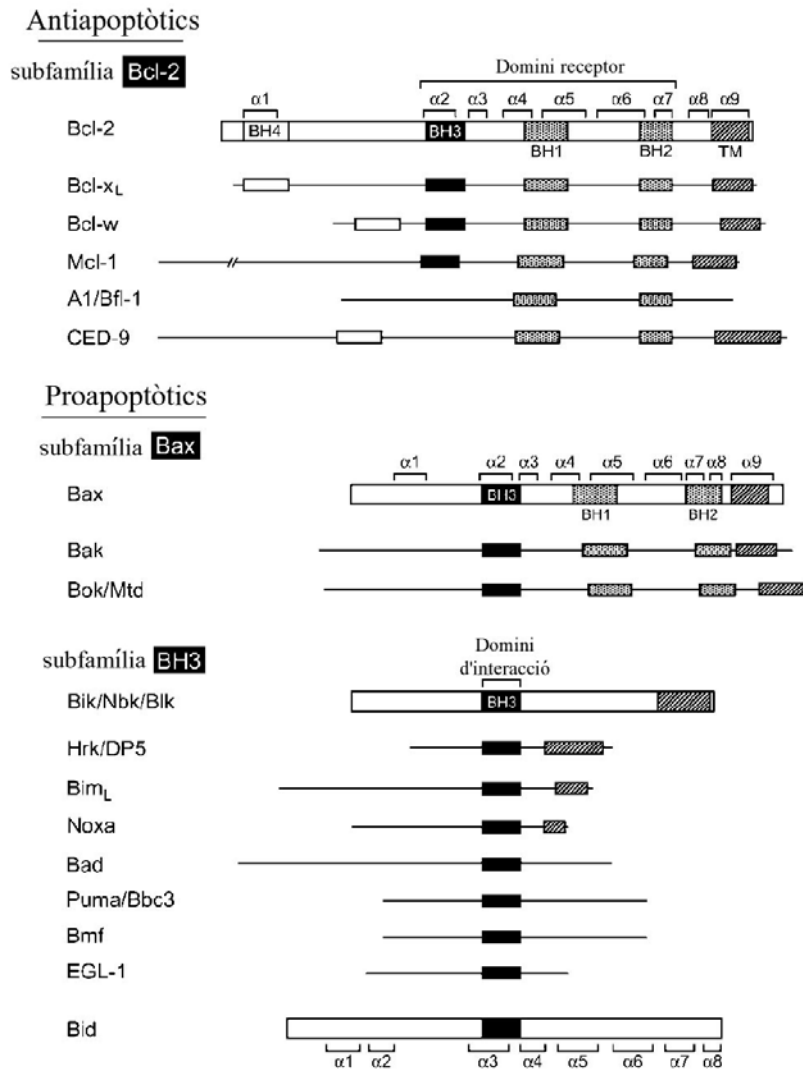


FIGURA-13. Membres de la família de Bcl-2. Es podem veure les tres subfamílies: els membres de la subfamília de Bcl-2 són promotors de la supervivència cel·lular, mentre que els membres de la subfamília de Bax i dels BH3-only promouen l'apoptosi. També es poden veure els homòlegs de *C. elegans* CED-9 i EGL-1. No estan representats els membres Boo/Diva, Bcl-Rambo, Bcl-G, Bcl-B, Bcl-X_S, BNIP3 i NIP3, perquè la seva funció no és del tot clara. Es representa el domini BH3 (en negre i comú a tots els membres), els dominis BH1 i BH2 (puntejat), el domini BH4 present en algun dels membres antiapoptòtics (blanc), i el domini transmembrana (TM, ratllat) (Modificat de Cory et al., 2003).

2.3. INTERACCIÓ ENTRE ELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.

Hi ha diferents models a l'hora d'explicar quin és el funcionament d'aquests membres, com interaccionen entre ells i quina és la seva funció en la regulació de l'apoptosi. El corrent més acceptat avui dia, és que els membres BH3-only funcionen com a sensors cel·lulars al capdamunt de la cascada que desencadenarà l'apoptosi, integrant les diferents senyals de mort, de dany intracel·lular o supervivència. Un cop aquests membres BH3-only s'han activat, la majoria s'uniran a Bcl-2 o als altres membres antiapoptòtics per tal de neutralitzar la seva funció de supervivència. Al mecanisme pel qual es dona aquesta neutralització, s'hi ha arribat després de la cristallització individual i conjunta de diferents membres de la família. El domini BH3- α -hèlix amfipàtic dels membres BH3-only interaccionaria amb les butxaques hidrofòbiques que formen els dominis BH1, BH2 i BH3 dels membres antiapoptòtics. Una desregulació en els nivells d'algun dels membres de la família de Bcl-2, provocaria un balanç inadequat, que donaria lloc a la desregulació de la cèl·lula.

Abans es pensava que tots els membres BH3-only es podien unir indiferentment a tots els membres antiapoptòtics, però estudis quantitius més acurats han demostrat que no és així, sinó que hi ha preferències (Adams, 2003). Recentment, s'ha publicat un article on es realitza un estudi que demostra que les unions entre els membres antiapoptòtics i els BH3-only és específica, amb afinitats d'unió entre aquests membres que poden variar fins a 10.000 vegades (Figura-14). Els membres BH3-only Bim i Puma serien capaços d'unir-se amb una afinitat molt alta a tots els membres antiapoptòtics assajats, mentre que els altres BH3-only tindrien afinitats d'unió restringides a certs membres; Bad i Bmf semblen unir-se preferentment a Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-W, i menys a A1 i Mcl-1, mentre que Noxa és molt selectiu per Mcl-1 i A1, i no sembla unir-se als altres membres antiapoptòtics assajats. Els membres Bik, Hrk i Bid s'unirien preferentment a Bcl-X_L, Bcl-W i A1, i menys a Bcl-2 i Mcl-1. Per tant, sembla que la unió entre membres antiapoptòtics i BH3-only és molt específica; en general, Bcl-X_L i Bcl-W es comporten de manera similar, de manera propera al comportament de Bcl-2, mentre que Mcl-1 i A1 semblen tenir un comportament molt diferent (Chen et al., 2005b).

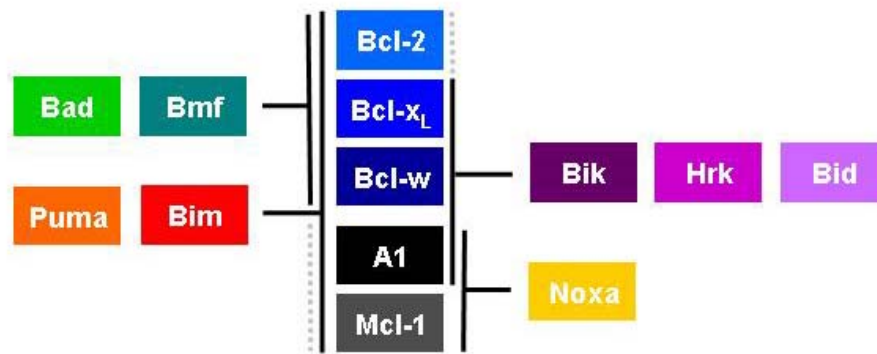


FIGURA-14. Model proposat per explicar la diferent capacitat per induir la mort dels diferents membres de la subfamília de BH3-only, degut a les unions específiques amb els membres antiapoptòtics (Modificat de Chen et al., 2005b).

2.4. FUNCIÓ DELS DIFERENTS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE BCL-2.

2.4.1. Les proteïnes BH3-only com a sensors cel·lulars.

El fet que en els mamífers hi hagi un gran nombre de proteïnes BH3-only, sembla ser conseqüència d'un procés evolutiu encaminat a donar un control sofisticat i específic sobre l'inici del procés de mort cel·lular, en funció de l'estímul desencadenant (Puthalakath i Strasser, 2002). Alguns dels BH3-only només s'expressen en certs tipus cel·lulars, i alguns semblen controlar un compartiment subcel·lular molt específic.

Cada un dels membres BH3-only respon enfront un tipus d'agressió molt concret (Figura-15). Per exemple, Bim és imprescindible *in vivo* per l'eliminació dels limfòcits autoreactius, i *in vitro* per l'apoptosi de les cèl·lules T després de la deprivació de citocines (Bouillet et al., 1999, 2002); Bad es necessita per la mort induïda per la retirada de glucosa o d'EGF (de *epidermal growth factor*) (Ranger et al., 2003); Bmf és necessari per l'*anoikis* (que és l'apoptosi que pateixen les cèl·lules epitelials quan són desenganxades de la seva matriu extracel·lular) (Puthalakath et al., 2001). Els gens *noxa* (Oda et al., 2000) i *puma* (Han et al., 2001; Nakano i Vousden, 2001), són induïts pel gen supressor de tumors *p53*, pel que són dos gens claus en l'apoptosi induïda per agents genotòxics (Villunger et al., 2003).

Cada un dels membres BH3-only és regulat de diferent manera: els gens *hrk*, *noxa* i *puma* són regulats a nivell transcripcional. Altres membres se sintetitzen constantment, però són mantinguts en formes latents no actives, requerint-se certes modificacions

per activar-les, com Bad, que és segrestat per les proteïnes 14-3-3 després de la fosforilació per Akt/PKB o PKA (Zha et al., 1996). Contràriament, Bik requereix ser fosforilat per activar-se (Verma et al., 2001). Bid, a més de patir un processament per caspases o per la granzima B, podria també ser regulat per fosforilació (Desagher et al., 2001). Bim i Bmf podrien tenir la funció de controlar l'estat del citoesquelet, ja que les isoformes predominants de Bim (Bim_{EL} i Bim_L) es troben segrestades als microtúbuls, a la cadena lleugera de la dineïna (DLC1/LC8) i Bmf es troba unit al complex motor de la miosina a través de la interacció amb DLC2 (Puthalakath et al., 1999, 2001).

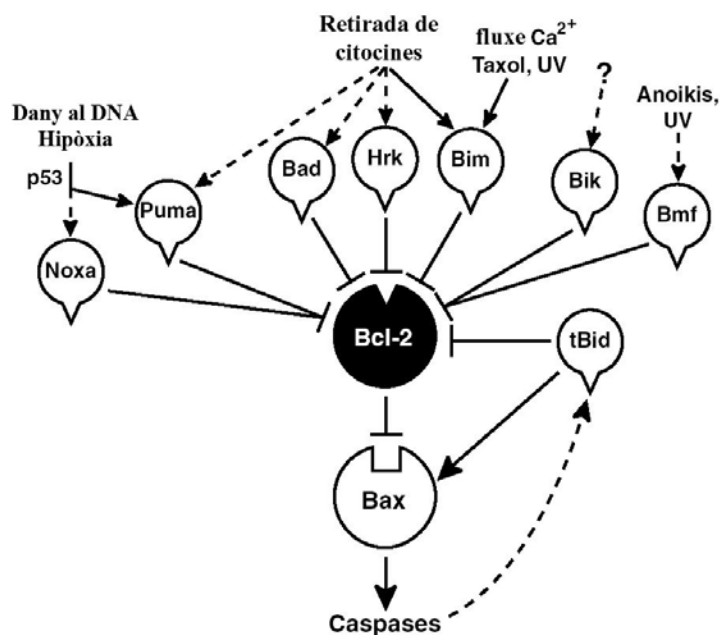


FIGURA-15. Cada un dels membres BH3-only respon enfront d'un tipus d'agressió molt concret, tot i que hi ha solapament de funcions entre els diferents membres. Els diferents estímuls apoptòtics fan que s'activen aquests membres, que ho poden fer per mitjà d'una activació transcripcional (com és el cas de Hrk, Noxa i Puma) o mitjançant regulacions postraduccional (com és el cas de Bim, Bmf, Bad, Bik o Bid). Tots aquests membres, un cop activats, tenen la capacitat d'unir-se i inactivar a Bcl-2 o altres membres antiapoptòtics de la família, de manera selectiva i específica. Bid, després de ser proteolitzat pot interaccionar directament amb Bax i activar-lo (Modificat de Cory et al., 2003).

2.4.2. Les proteïnes antiapoptòtiques: els protectors de la mort.

Els estudis genètics fets a ratolins (Ranger et al., 2001) suggereixen que la supervivència de cada tipus cel·lular requereix de la protecció d'almenys un homòleg de Bcl-2. Tot i el patró d'expressió solapat dels diferents membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, la inactivació puntual d'aquests gens condueix a fenotips concrets. El gen *bcl-2* és essencial per la supervivència de les cèl·lules del fetge, de les cèl·lules precursors de melanòcits, així com també de les cèl·lules limfoides madures (Nakayama et al., 1993, 1994; Veis et al., 1993; Kamada et al., 1995); *bcl-X_L* ho és per les cèl·lules precursors neuronals i d'eritròcits (Motoyama et al., 1999); *bcl-W* ho és pels progenitors de les cèl·lules espermàtiques en individus adults (Print et al., 1998; Ross et al., 1998); *a1* és essencial pels neutròfils (Hamasaki et al., 1998) i *mcl-1* és essencial per la implantació del zigot a l'úter (Rinkenberger et al., 2000). Els estudis genètics indiquen clarament que per mantenir el control de l'homeòstasi, cal un balanç adequat entre membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 i els seus antagonistes BH3-only.

2.4.3. Les proteïnes proapoptòtiques multidomini: els detonants de la mort.

Aquests membres de la família de Bcl-2 són indispensables per a desencadenar la mort cel·lular, ja que cap dels BH3-only pot desencadenar la mort en absència de Bax i Bak, que són essencials per la via intrínseca d'apoptosi (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001). La inactivació d'un dels dos gens té poques conseqüències, però l'eliminació dels dos gens alhora impedeix l'apoptosi durant el desenvolupament a la majoria de teixits, que acaba desencadenant una mort perinatal, o l'alteració de la selecció tímica i l'homeòstasi de les cèl·lules limfoides (Rathmell et al., 2002). Les cèl·lules deficientes en Bax i Bak són resistents als estímuls intracel·lulars de mort que operen per via mitocondrial. Les proteïnes Bax i Bak també són relacionades directament amb l'apoptosi iniciada des del reticle endoplàsmic, desencadenada per l'alteració de l'homeòstasi dels nivells de calci o l'excés de proteïnes mal plegades (Scorrano et al., 2003).

En resposta a senyals citotòxiques, Bax i Bak pateixen canvis conformacionals, que els permet formar homoligòmers associats a la membrana, els quals poden formar grans clusters. Encara no està clar quins són els senyals que activen Bax i Bak. S'ha proposat que tBid (que és la forma processada de Bid), podria activar les dues proteïnes o que Bax podria estar segrestat al citosol per diferents proteïnes, com la 14-3-3 (Nomura et al., 2003) o la proteïna involucrada a la reparació del DNA Ku70

(Sawada et al., 2003). Un cop s'han activat aquests membres proapoptòtics multidomini, provoquen danys al mitocondri que permeten l'alliberament dels diferents activadors apoptòtics: el citocrom-c que activarà Apaf-1 (Liu et al., 1996), Smac/Diablo i Omi/HtrA2, que antagonitzaran l'habilitat de les IAPs d'inhibir les caspases (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Susuki et al., 2001), l'endonucleasa-G, que ajudarà a la CAD (de *caspase-activated DNAase*) a la fragmentació del DNA (Li et al., 2001) i la flavoproteïna AIF, implicada en la condensació de la cromatina i en la degradació del DNA (Joza et al., 2001). S'han proposat diferents models per explicar com Bax i Bak provoquen la sortida d'aquests activadors apoptòtics: (i) Bax i Bak podrien formar un porus a la membrana mitocondrial externa que permetria la sortida d'aquests activadors; (ii) l'oligomerització de Bax i Bak podria fer variar la composició lipídica de la membrana mitocondrial externa, fent-la més permeable o formant canals lipídics; (iii) possible interacció de Bax amb diferents proteïnes mitocondrials com VDAC o ANT. A la Figura-16 es pot veure el mecanisme de sortida del citocrom-c regulat pels diferents membres de la família de Bcl-2.

MAMÍFERS

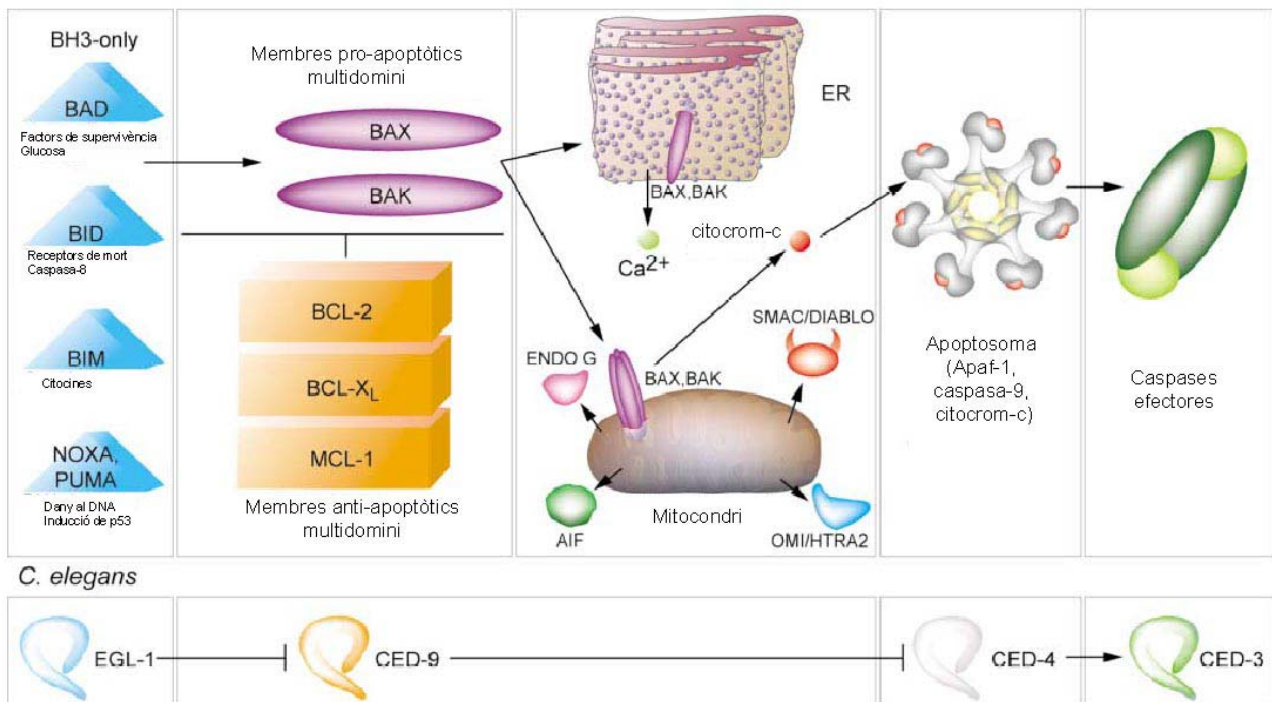


FIGURA-16. Regulació de la sortida del citocrom-c mediada pels diferents membres de la família de Bcl-2. Els membres BH3-only actuarien com a sensors de diferents alteracions cel·lulars. Aquests interactuen i inhibeixen als diferents membres antiapoptòtics, possibilitant la sortida dels activadors apoptòtics del mitocondri regulada per Bax i Bak, que desencadenarà la formació de l'apoptosoma, que portarà a l'activació de les caspases. També es mostren els homòlegs en el nemàtode *C. elegans* (Modificat de Danial i korsmeyer, 2004).

2.5. Paper de la família de Bcl-2 a l'oncogènesi.

Paper dels membres antiapoptòtics.

La capacitat oncogènica de Bcl-2 va ser descrita, com s'ha comentat anteriorment, a la translocació t(14;18) a malalts amb limfoma folicular, on s'activa constitutivament l'expressió del gen, degut a que es col·loca sota control del *locus* del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines. En canvi, en alguns casos de leucèmia limfàtica crònica, una variant de la translocació activa el gen *bcl-2* per fusió amb els *loci* de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines (Adachi et al., 1990). Tots els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 són potencialment oncogènics, però en totes les malalties analitzades, les mutacions directes que afecten aquests membres semblen ser molt rares. Certes mutacions oncogèniques actuen incrementant els seus nivells indirectament, com pot ser per la via del factor de transcripció NF-κB, activada en moltes malalties humanes, capaç d'induir els gens *bcl-X_L* i *a1* (Grumont et al., 1999). En molts tumors es troben nivells alts d'aquestes proteïnes, però això s'ha d'interpretar amb precaució, ja que l'expressió dels membres de la família de Bcl-2 pot canviar bastant durant els diferents estadis de diferenciació, i les cèl·lules tumorals acostumen a ser menys diferenciades que les cèl·lules no tumorals del voltant (Cory, 1995).

Paper dels membres proapoptòtics.

Donat el paper oncogènic dels membres antiapoptòtics, es podria pensar que els membres proapoptòtics haurien d'actuar com a gens supressors de tumors. Com que hi ha redundància de funció entre els membres proapoptòtics, la funció com a supressor de tumors només s'arriba a donar en tipus cel·lulars específics i en certes situacions.

Bim sembla ser un candidat idoni per funcionar com un gen supressor de tumors, ja que és el major regulador de l'homeòstasi dels limfòcits, i està localitzat a una regió on s'han descrit alteracions a diferents malalties humanes, la majoria d'origen hematopoiètic. La inactivació de Bid fa desenvolupar leucèmia mielomonocítica crònica al 50% dels ratolins als dos anys (Zinkel et al., 2003). Un cop sabut el paper de Bmf en l'*anoikis*, seria interessant determinar si aquest contribueix a la metastasi. Dos gens especialment atractius com a supressors de tumors són *nox* i *puma*, ambdós induïts transcripcionalment pel supressor tumoral p53. Com que Bax i Bak tenen funcions redundants, és d'esperar que l'inducció tumoral requereixi la inactivació dels dos gens, i potser també de Bok en els teixits on s'expressi.

2.6. MCL-1.

Mcl-1 és un dels membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2. Actua com a molècula apical en el control de l'apoptosi, interferint en els estadis primerencs d'aquest procés, promovent la supervivència de la cèl·lula. El gen *mcl-1* va ser identificat per primer cop al 1993 pel grup de la Dra. Craig, aïllat com un gen d'inducció-temprana a la línia cel·lular de leucèmia mieloide humana ML-1, durant la inducció de la diferenciació amb èsters de forbol (TPA), d'aquí el nom d'Mcl-1 (de *myeloid cell leukaemia-1*) (Kozopas, et al., 1993). Una característica important d'Mcl-1 és que tant el missatger com la proteïna tenen una vida mitja molt curta.

2.6.1. Estructura d'Mcl-1.

El gen *mcl-1*, en humans, es localitza al cromosoma 1, concretament a la posició 1q21 (Craig, 1995), una regió que sembla estar alterada freqüentment a malalties neoplàsiques. L'inici de transcripció majoritari del gen s'ha mapat a 80 nucleòtids abans del codó d'inici de traducció, i el gen té tres exons i dos introns (codi d'entrada al GeneBank corresponent al cDNA humà d'*mcl-1*: L08246). S'ha trobat una gran similitud entre les regions codificants i la regió 3'-no traduïda del gen *mcl-1* humà i murí, al contrari que a la regió promotora, on s'ha trobat una baixa similitud de seqüència, tot i compartir seqüències d'unió a factors de transcripció comuns, pel que podrien estar subjectes a una regulació semblant. No s'ha detectat cap caixa TATA consensus a prop de l'inici de transcripció (Akgul, et al., 2000).

La proteïna Mcl-1 (també anomenada Mcl-1L, ja que es refereix a la proteïna sencera i no a les formes generades per variants d'*splicing* o generades per processament de les caspases) té 350 aminoàcids, i conté una sèrie de dominis característics. Com tots els membres de la família de Bcl-2, posseeix els dominis característics de la família, els dominis BH, que els hi permeten formar interaccions proteïna-proteïna, i són de vital importància en la regulació de l'apoptosi. Mcl-1 té els dominis BH1, BH2 i BH3, però a diferència d'altres membres antiapoptòtics de la família, com Bcl-2 i Bcl-X_L, sembla perdre el domini BH4 de l'extrem amino-terminal. L'absència del domini BH4 en Mcl-1 indueix a pensar que interactuaria amb proteïnes diferents a les que ho fan Bcl-2 i Bcl-X_L. Com molts dels altres membres de la família de Bcl-2, Mcl-1 té a la part carboxi-terminal un domini transmembrana (TM) que li permet inserir-se a diferents membranes intracel·lulars, sobretot a la membrana mitocondrial externa, on s'hi troba

freqüentment associat. A l'extrem amino-terminal es troben dues seqüències PEST, riques en residus aminoacídics de prolina, àcid glutàmic, serina i treonina. Les seqüències PEST s'acostumen a trobar a les proteïnes que tenen un recanvi ràpid i una vida mitja molt curta, com Mcl-1, que pot anar des de 30 minuts fins a poques hores depenent del model cel·lular d'estudi (Craig, 2002). Tot i això, s'ha descrit que la supressió de les seqüències PEST no altera l'estabilitat d'Mcl-1, pel que aquestes seqüències no serien les responsables de la curta vida mitja d'Mcl-1 (Clohessy, 2004) (Figura-17). La via de degradació del proteasoma sembla ser la principal responsable del ràpid recanvi de la proteïna (Nijhawan et al., 2003).

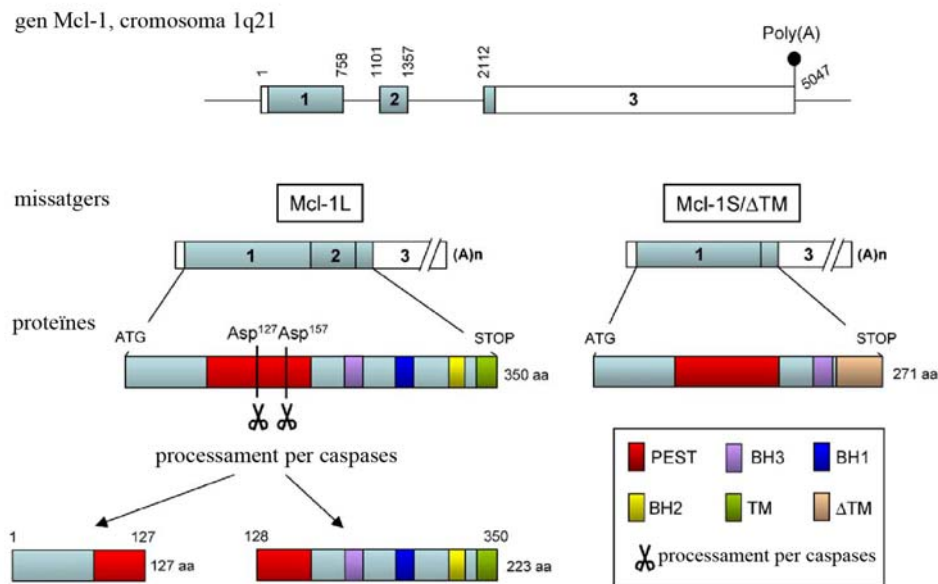


FIGURA-17. Es mostra l'estructura genòmica del gen Mcl-1, el missatger i la proteïna, amb els seus principals dominis. També es representen les diferents formes generades per *splicing* alternatiu, així com els llocs de processament de les caspases (Modificat de Michels et al., 2005).

S'ha caracteritzat una segona isoforma proteica d'Mcl-1 generada per *splicing* alternatiu, generant una proteïna més curta de 271 aminoàcids, Mcl-1S/ΔTM. Aquesta forma més curta, a la seva part amino-terminal segueix mantenint les seqüències PEST i el domini BH3, igual que la proteïna Mcl-1 sencera, però a diferència d'aquesta, Mcl-1S/ΔTM perd els dominis BH1, BH2 i el domini transmembrana (Bae et al., 2000; Bingle et al., 2000) (veure Figura-17)). Tot i que no es coneix encara prou be

la funció d'aquesta isoforma, l'estructura d'Mcl-1S/ Δ TM s'assembla bastant a la d'alguns membres proapoptòtics del grup BH3-only. La sobreexpressió d'aquesta proteïna truncada promou la mort cel·lular, en contraposició a la funció de la proteïna sencera. Per Western blot es poden detectar altres isoformes d'Mcl-1, que són degudes a diferents nivells de fosforilació, llocs d'inici de traducció alternatius o bé al processament de la proteïna per caspases. També s'ha descrit que Mcl-1 és substrat de la granzima-B, que un cop processat impediria la unió amb el membre proapoptòtic BIM, que induiria l'alliberament del citocrom-c (Han et al, 2004). Tot i que es coneix l'existència d'aquestes diferents formes d'Mcl-1, les seves funcions no estan ben caracteritzades.

2.6.2. Síntesi i degradació d'Mcl-1.

El patró d'expressió oscil·lant d'Mcl-1, al llarg del procés de diferenciació de les cèl·lules, és indicatiu que el gen ha d'estar regulat per factors específics que afecten el creixement, la viabilitat i la diferenciació cel·lular. L'augment dels nivells de proteïna induïts per TPA, o per diferents factors de creixement, solen correlacionar amb increments en els nivells de missatger, que no requereixen de la síntesi proteica *de novo*, com és propi dels gens de resposta ràpida (Yang et al., 1996; Chao et al., 1998). La proteïna Mcl-1 s'expressa en un gran ventall de tipus cel·lulars, tant en el desenvolupament embrionari com als teixits adults, amb uns nivells d'expressió variables depenent de l'estadi de diferenciació i del tipus de teixit. Els nivells més alts d'Mcl-1 són detectats a les capes apicals més diferenciades dels epitelis (com pot ser en els epitelis de pròstata, pit, còlon i pulmó), mentre que l'expressió de Bcl-2 sol ser elevada a la part basal de l'epiteli. Al sistema limfoide, Mcl-1 s'expressa abundantment als centres germinals de cèl·lules-B, al contrari de Bcl-2 que es troba a les cèl·lules clonals B de la zona del mantell (Krajewski et al., 1994; 1995).

Els senyals de supervivència, citocines, senyals de diferenciació o factors de creixement, indueixen augments en l'expressió de la proteïna Mcl-1. Les vies de la MAPK (de mitogen-activated protein kinase), la PI3K (de phosphatidylinositol-3 kinase), de JAK/STAT (de Janus Kinase / signal transducer and activator of transcription), i de p38 MAPK han estat implicades en l'estimulació de la transcripció del gen *mcl-1*, actuant específicament sobre elements de resposta de factors de transcripció presents al promotor d'*mcl-1*, com GM-CSF (de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), interleucina-3 (IL-3), i per gonadotropines a l'ovari de rates

(Chao et al., 1998; Leo et al., 1999; Inoshita et al., 2002). No sembla que hi hagi regulació transcripcional per NF κ B, tot i la importància d'aquest factor a la supervivència induïda per algunes citocines i la implicació d'aquest en les vies de supervivència (Craig, 2002).

Durant l'apoptosi induïda a molts models cel·lulars, l'expressió d'Mcl-1 disminueix, moltes vegades en contra del que passa amb altres membres antiapoptòtics de la família, com Bcl-2 o Bcl-X_L (Craig, 2002). En aquesta disminució dels nivells d'Mcl-1 hi poden estar jugant un paper important les caspases, en especial les caspases efectores com la caspasa-3. Aquestes caspases poden processar la proteïna Mcl-1 per dos llocs, després de dos residus d'àcid aspàrtic (Asp¹²⁷ i Asp¹⁵⁷) (Snowden et al., 2003; Weng et al., 2005). Aquests residus d'àcid aspàrtic es troben dintre de les seqüències PEST i estan conservats des de la proteïna Mcl-1 del peix zebra fins als mamífers, essent l'Asp¹²⁷ el lloc de processament preferent per les caspases. El fragment carboxi-terminal, que resulta del processament al residu Asp¹²⁷, és una proteïna proapoptòtica molt potent. Per tant, el processament de la proteïna Mcl-1 per caspases, està eliminant de la cèl·lula una molècula inductora de supervivència alhora que es genera una molècula molt efectiva com a inductora de mort (Figura-17) (Michels et al., 2005). També s'han descrit disminucions en l'activitat transcripcional del promotor o disminucions a la síntesi traduccional, per explicar el descens de la proteïna durant l'apoptosi induïda per diferents estímuls, com pot ser per la irradiació amb llum ultraviolada o infeccions víriques (Nijhawan et al., 2003; Cuconati et al., 2003).

Les modificacions post-traduccional d'Mcl-1 també poden modificar la seva activitat. Mcl-1 pot ser inactivat per fosforilació a la Ser¹²¹ i a la Thr¹⁶³ per la via de JNK en resposta a estrès oxidatiu (Inoshita et al., 2002). En alguns models, els èsters de forbol poden induir la fosforilació d'Mcl-1 via ERK, sense canviar la mobilitat electroforètica de la proteïna, mentre que agents com el Taxol i l'àcid Okadaic indueixen la hiperfosforilació d'Mcl-1 incrementant la mobilitat electroforètica (Domina 2000, 2004). Per tant, Mcl-1 està regulat a molts nivells, per aconseguir una expressió i activitat d'aquest gen molt acurades, per poder controlar finament les decisions cel·lulars.

2.6.3. Knock-out d'Mcl-1.

La característica més important del ratolí deficient en Mcl-1 és la letalitat embrionària, degut a que l'embrió no es pot preimplantar a l'úter, pel que no sobreviu més enllà de l'estadi de mòrula/blàstula. Durant el desenvolupament del ratolí, l'expressió d'Mcl-1 incrementa durant els estadis primerencs de l'embriogènesi. Els blastòcits d'Mcl-1^{-/-} no mostren evidències d'una apoptosi incrementada, però tenen un retardament en la maduració. Per tant, Mcl-1 és essencial per la preimplantació del zigot durant aquest estadi tant vulnerable del desenvolupament embrionari, i en tot cas després, actuaria regulant l'apoptosi (Rinkenberger et al., 2000). Treballs recents amb cèl·lules deficientes en Mcl-1 han demostrat que és una proteïna imprescindible pel desenvolupament i manteniment dels limfòcits B i T, i per la supervivència de les cèl·lules mare hematopoètiques (Opferman et al., 2003, 2005).

2.6.4. Funcions biològiques d'Mcl-1.

La ràpida inducció d'Mcl-1 enfront els senyals de supervivència i la ràpida degradació enfront als estímuls apoptòtics, indueixen a pensar que és una proteïna clau en el control de l'apoptosi en diferents models cel·lulars, en resposta a canvis ambientals ràpids. Mcl-1 sembla ser el membre de la família de Bcl-2 que seria ràpidament incrementat durant les transicions cel·lulars, per mantenir la viabilitat de les cèl·lules durant un breu període de temps, el suficient per permetre a la cèl·lula superar aquest període crític d'impàs cap a un nou destí cel·lular. D'altra banda, Mcl-1 també juga un paper fonamental en la supervivència de les cèl·lules malignes, ja que la depleció dels nivells d'Mcl-1 mitjançant oligonucleòtids *antisense* dispara l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Derenne et al., 2002).

La proteïna Mcl-1 és essencial durant l'embriogènesi, desenvolupament i manteniment dels limfòcits B i T. L'expressió d'Mcl-1 és baixa a les cèl·lules B *naïve* i a les cèl·lules memòria, i és alta als centres germinals de cèl·lules B, mentre que Bcl-2 mostra un patró d'expressió recíproc (Krajewski et al., 1993, 1995; Lomo et al., 1996; Opferman et al., 2003, 2005). Encara no es té la certesa de quin és el mecanisme exacte pel qual Mcl-1 promou la viabilitat cel·lular, tot i que es creu, que té a veure amb la supressió de l'alliberament del citocrom-c del mitocondri, probablement per la heterodimerització i neutralització dels membres proapoptòtics de la família de Bcl-2, com Bim o Bak (Cuconati et al., 2003). La leucèmia limfàtica crònica es deu principalment a un defecte

a l'apoptosi, probablement deguda a alteracions als membres de la família de Bcl-2. El ratolí transgènic que sobreexpressa Mcl-1 té molts limfomes de cèl·lules B, mentre que el ratolí condicional per la pèrdua d'Mcl-1 mostra una gran reducció de limfòcits B i T (Johnston et al., 2004).

Mcl-1 també s'indueix per estímuls exògens en teixits no hematopoètics, com pot ser a l'ovari, on les gonadotropines estimulen l'inducció d'Mcl-1 i promouen el desenvolupament de l'oòcit, pel que aquest gen també té un paper important en el procés de fertilitat, regulant processos importants a l'ovulació, embriogènesi i desenvolupament de la placenta (Rinkenberger et al., 2000).

Tot i semblar un fet paradoxal, els nivells d'Mcl-1 s'indueixen en resposta a certs estímuls citotòxics, com pot ser l'exposició a l'agent despolimeritzador de microtubuls colchicina. Es creu que Mcl-1 s'induiria ràpidament per tal de promoure la supervivència de la cèl·lula, durant un breu període després de l'exposició a l'agent citotòxic, per donar temps a que s'indueixin altres membres promotors de la viabilitat cel·lular, o bé per iniciar el procés d'apoptosi (Zhou et al., 1997, 1998; Townsend, K.J., et al., 1998, 1999). També s'ha descrit que la hipòxia pot induir la transcripció d'Mcl-1 (Piret et al., 2005).

S'ha demostrat, a les cèl·lules HeLa, que durant l'apoptosi induïda per radiació ultraviolada (que indueix la ubiqüitinització i degradació de la RNA polimerasa II, pel que s'atura la transcripció, i indueix la fosforilació del factor eIF2 α , pel que s'inhibeix la traducció de proteïnes) es requereix de l'eliminació de certs inhibidors citosòlics perquè es doni l'alliberament del citocrom-c del mitocondri i la subseqüent activació de les caspases; aquests inhibidors citosòlics són Mcl-1 i Bcl-X_L. Durant el tractament amb radiació ultraviolada, es bloqueja la síntesi proteica d'Mcl-1, i el remanent de proteïna Mcl-1 existent és ràpidament degradat pel proteasoma. Una vegada s'ha produït aquest fet, es transloca Bcl-X_L i Bax al mitocondri, on es dona la oligomerització de Bax, que possibilita la sortida del citocrom-c i activació de les caspases. Per tant, Mcl-1 esdevé com un sensor cel·lular dels canvis en les taxes de síntesi de missatger i proteïna induïts per qualsevol agressió o estrès apoptòtic (Nijhawan et al., 2003). S'ha descrit que durant la inducció d'apoptosi per diferents agents a les cèl·lules Jurkat no hi ha canvis en Mcl-1 fins que les caspases no estan activades (Clohessy et al., 2004). A la Figura-18 es proposen diferents models de com pot regular Mcl-1 el procés d'apoptosi, depenent dels senyals de supervivència o de mort que rep la cèl·lula.

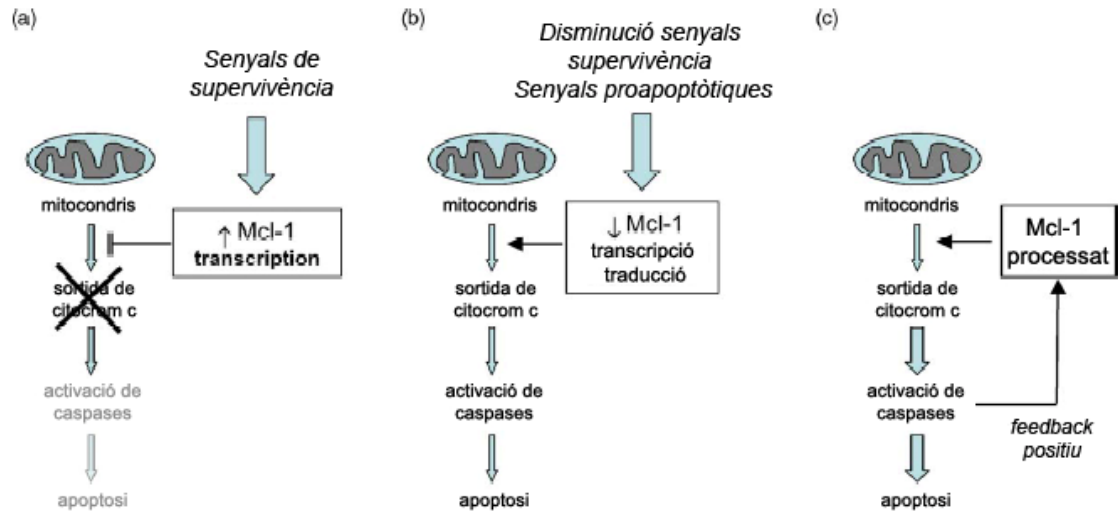


FIGURA-18. Regulació de l'apoptosi per Mcl-1. Al model-A la inducció a nivell transcripcional d'Mcl-1 pels senyals de supervivència pot proporcionar resistència a l'apoptosi. Al model-B la disminució dels nivells d'Mcl-1, tant a nivell de regulació transcripcional com de reducció de la síntesi proteica, induïts per la retirada de factors de supervivència del medi o bé per senyals inductores de mort, pot desencadenar l'alliberament del citocrom-c del mitocondri, activant el procés d'apoptosi. Al model-C, l'activació de les caspases durant l'apoptosi provoca el processament d'Mcl-1, generant la forma proapoptòtica que amplificarà el procés de mort (Modificat de Mitchels et al., 2005).

És possible que Mcl-1 tingui altres funcions a la cèl·lula. També pot ser un factor clau implicat en la diferenciació cel·lular i el control del cicle cel·lular. Per exemple, Mcl-1 s'uneix al factor PCNA (de *proliferating cell nuclear antigen*), fet que provoca una aturada del cicle cel·lular, mentre el factor de transcripció E2F1, un regulador clau del cicle cel·lular, reprimeix l'expressió d'*mcl-1* (Fujise et al., 2000; Croxton et al., 2002).

Mcl-1 es considera en algunes circumstàncies, el substitut de Bcl-2 en les cèl·lules hematopoietiques, sobretot perquè la seva localització a la cèl·lula difereix a la de Bcl-2 (Yang et al., 1995). Als neutròfils, pràcticament no hi ha expressió de Bcl-2 ni Bcl-X_L, pel què Mcl-1 té un paper clau en la regulació d'aquestes cèl·lules, on els nivells d'Mcl-1 correlacionen molt bé amb la cinètica de supervivència. Les cèl·lules no apoptòtiques tenen nivells alts d'Mcl-1, mentre que les cèl·lules apoptòtiques tenen nivells baixos (Edwards et al., 2004).

2.7. BIM.

BIM és un dels membres proapoptòtics (com el seu nom indica *Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death*), de la subfamília BH3-only. BIM és un regulador important en l'homeòstasi del sistema immunitari i un dels principals reguladors de l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars. El fet de que la pèrdua d'un sol al·lel de BIM acceleri la taxa de formació de limfomes, l'ha fet classificar com un gen supressor de tumors (Egle et al., 2004a). La retirada de factors de creixement del medi, el tractament amb drogues apoptòtiques o l'*anoikis*, entre altres factors, indueixen un increment en l'expressió de BIM en diferents models cel·lulars, suggerint que la regulació transcripcional de BIM pot ser un punt clau als estadis més primerencs del procés de mort.

2.7.1. Estructura de BIM.

El gen *bim* humà està localitzat al cromosoma 2q12-q13 (Bouillet et al., 2001), regió on s'han descrit alteracions, principalment delecions, a 14 malalties humanes diferents, la majoria d'origen hematopoiètic. El gen *bim* es transcriu en diferents isoformes generades per *splicing* alternatiu. Les diferents isoformes difereixen en el tamany i en la seva activitat proapoptòtica. En un principi es van descriure les tres formes majoritàries de BIM, conegudes amb el nom de BIM_{EL} (de *extra large*), BIM_L (de *large*) i BIM_S (de *short*) (O'Connor et al., 1998), i més tard es van anar identificant totes les altres isoformes, més o menys abundants i amb diferents funcions depenent del teixit (U et al., 2001; Marani et al., 2002; Chen et al., 2004b; Adachi et al., 2005) (Figura-19).

El domini BH3 de BIM, l'única regió homòloga amb els altres membres de la família de Bcl-2, és essencial per l'acció citolítica de BIM i per la interacció amb els membres antiapoptòtics de la família (O'Connor et al., 1998).

Algunes de les isoformes perden el domini BH3, mentre que d'altres perden el domini d'unió a les cadenes lleugeres de la dineïna, on es troben unides algunes de les isoformes. Aquestes isoformes poden funcionar com a *decoys* de les isoformes proapoptòtiques, i poden ser una forma de regulació dins del grup de proteïnes BH3-only (Adachi et al., 2005).

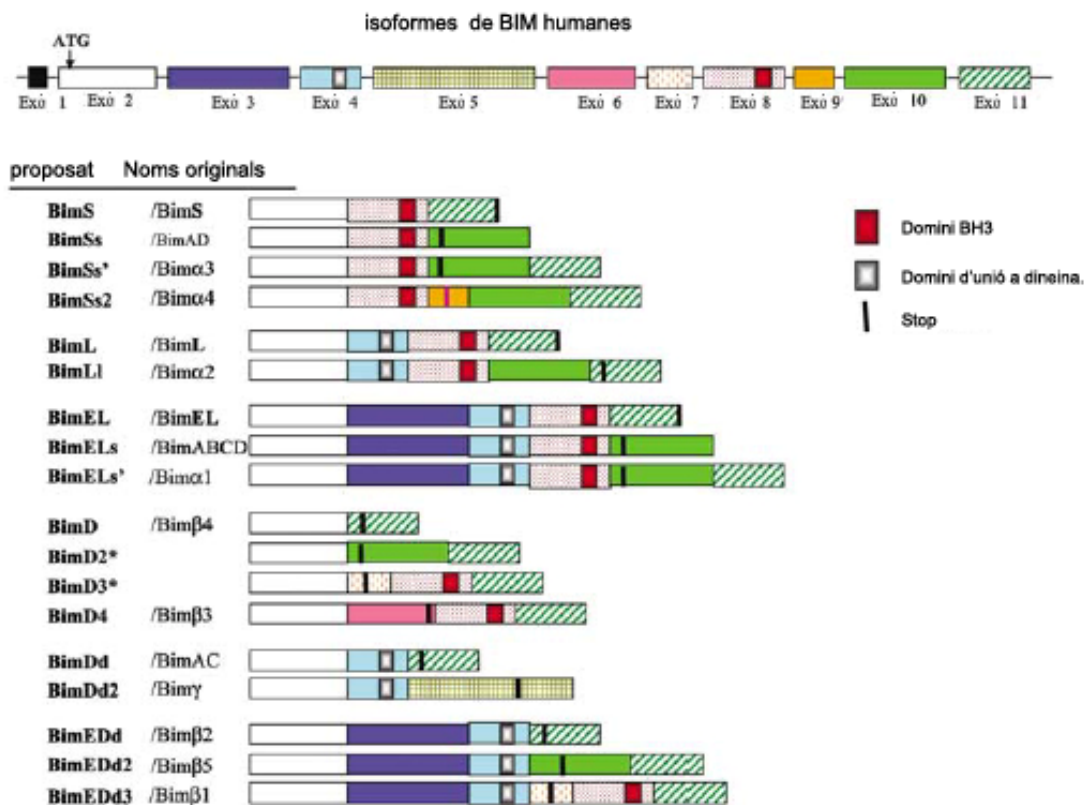


FIGURA-19. Esquema de les diferents isoformes identificades de BIM i on es proposa una nomenclatura per tal d'uniformitzar els diferents noms que s'han donat a cada una d'elles (modificat d'Adachi et al., 2005).

2.7.2. Síntesi i degradació de BIM.

Els nivells de missatger i proteïna de BIM són molts baixos a la majoria de cèl·lules viables, però són incrementats ràpidament després de la retirada de factors de supervivència en limfòcits, neurones i fibroblasts. La funció de BIM està regulada almenys per quatre mecanismes diferents, depenent molt del model cel·lular i del factor d'estudi.

El primer dels mecanismes implica la regulació del missatger de bim. Els nivells de missatger disminueixen en presència de citocines, on estan implicades diferents vies de transducció del senyal depenent del model d'estudi. La retirada de citocines del medi induïx la desfosforilació i l'activació del factor de transcripció FKHR-L1, de la família de factors de transcripció Forkhead, induïnt l'activació transcripcional de *bim*, sense necessitat de síntesi proteica *de novo*. Diferents interleucines induïxen la PI3K, i

aquesta a l'Akt/PKB, que fosforila el factor de transcripció FKHR-L1 inhibint-lo (Dijkers et al., 2000; Shinjyo et al., 2001; Rosas et al., 2005). En el model de fibroblastes CC139 s'ha descrit que l'inhibidor de PI3K, LY294002, causa un increment de 25 vegades els nivells de missatger de *bim*, que va seguit d'augment de la proteïna (Ley et al., 2003). En estudis realitzats a neurones, la retirada del factor NGF, indueix l'activació de la via JNK, que faria incrementar els nivells de missatger de *bim* (Putcha et al., 2001; Whitfield et al., 2001; Gilley et al., 2003). En cèl·lules limfoides, s'ha vist que un dels mecanismes pels quals el glucocorticoid dexametasona indueix apoptosi, és la inducció de les tres isoformes proteiques majoritàries de BIM (Wang et al., 2003). També s'ha descrit que la inducció de *bim* és un dels punts crítics en l'apoptosi desencadenada pels factors que indueixen increments en l'AMPc (Zhang i Insel, 2004).

Un segon nivell de regulació és la localització subcel·lular de BIM. Les isoformes BIM_{EL} i BIM_L, però no la BIM_S, es troben associades a la cadena lleugera de la dineïna (LC8), pel que estan unides al citoesquelet de microtúbuls. Tot i això, en resposta a certs estímuls apoptòtics BIM_{EL} i BIM_L són alliberats dels microtúbuls i van al mitocondri (Puthalakath et al., 1999). La majoria de les formes de BIM associades al mitocondri, estan interactuant amb els diferents membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, inhibint-los (Zhu et al., 2004).

Un tercer nivell de regulació és la fosforilació de la isoforma BIM_{EL} a la Ser-109 i Thr-110, on està implicada la via de MEK/MAPK, que suprimeix l'acció proapoptòtica de BIM_{EL}, sense afectar la unió a LC8 ni la seva localització subcel·lular (Biswas i Greene, 2002). També s'ha demostrat que les isoformes de BIM_{EL} fosforilades que estan lliures al citosol, poden ser processades per les caspases en estadis primerencs d'apoptosi, generant un fragment de la part amino-terminal que seria molt més eficient en l'inducció d'apoptosi, creant així un *loop* d'amplificació del procés (Chen et al., 2002a; Chen i Zhou; 2004a).

L'últim nivell de regulació descrit, implica la degradació per la via del proteasoma de la isoforma BIM_{EL}, on està implicada la via de MEK/MAPK (Akiyama et al., 2003). Els nivells de proteïna BIM_{EL} decauen relativament poc a poc en un medi sense sèrum, amb una vida mitja d'aproximadament 8 hores. L'estimulació amb sèrum redueix ràpidament els nivells de BIM_{EL}, amb una vida mitja d'unes 3 hores, degut a la fosforilació via ERK1/2 de la proteïna i a la degradació per la via del proteasoma (Weston et al., 2003; Ley et al., 2003; 2004). S'ha demostrat en diferents models, que

el TPA indueix la fosforilació de BIM_{EL} a la serina-69 via ERK1/2, portant-la a ser degradada pel proteasoma (Luciano et al., 2003).

2.7.3. Knock-out de BIM.

El ratolí *Knock-out* per *bim* presenta unes característiques que evidencien l'important paper fisiològic de BIM; les cèl·lules limfoides i mieloides s'acumulen, s'altera el desenvolupament de les cèl·lules T i els ratolins d'edat avançada acumulen cèl·lules plasmàtiques i acaben morint per malaltia hepàtica autoimmune. El ratolí deficient en *bim* presenta un nombre elevat, en sang perifèrica, de monòcits madurs, granulòcits i limfòcits, amb un sobrecreixement dels precursors hematopoiètics al moll de l'os. A més, els limfòcits són refractaris a certs estímuls apoptòtics, com la deprivació de citocines o l'alteració dels microtúbuls. Per tant, BIM és un regulador essencial del nombre de cèl·lules blanques, per l'homeòstasi hematopoiètica i com a barrera per l'autoimmunitat (Bouillet et al., 1999).

Del creuament entre ratolins *bim*^{+/-} apareix una descendència *bim*^{-/-} sana i fèrtil, però el seu número és inferior a la meitat de la progènie *bim*^{+/+}. Aquest fet demostra que BIM pot tenir un paper important durant el desenvolupament embrionari, encara que de moment es desconeix (Bouillet et al., 1999).

2.7.4. Funcions biològiques de BIM.

El *Knock-out* de *bim* mostra clarament, que és un gen crític per l'homeòstasi dels limfòcits, que serveix de barrera contra les malalties infeccioses, que és necessari per la resposta apoptòtica desencadenada per algunes senyals d'estrès, i que és necessari per l'apoptosi dels timòcits autoreactius induïda per l'estimulació TCR-CD3 (Bouillet et al., 1999; 2002). També s'ha demostrat que BIM és essencial en l'eliminació de limfòcits B autoreactius *in vivo*, i que els limfòcits deficientes en BIM no són sensibles a l'apoptosi induïda pel BCR *in vitro* (Enders et al., 2003; Mouhamad et al., 2004). La disminució de BIM és important en la inducció de supervivència per l'activació de Bcr-Abl a les cel·lules hematopoiètiques (Kuribara et al., 2004).

La retirada de citocines del medi pot inactivar la quinasa PKB (o possiblement GSK, de serum and glucocorticoid-induced kinases), el que faria caure els nivells d'Mcl-1 i

desforforilar el membre proapoptòtic Bad i el factor de transcripció FKHR-L1, activant-los. FKHR-L1 pot incrementar els nivells de BIM i p27^{KIP1}. En aquest escenari, p27^{KIP1} aturaria la progressió del cicle cel·lular i ajudaria a BIM i Bad a induir la sortida del citocrom-c del mitocondri, pel què la cèl·lula entraria en apoptosi (Dijkers et al., 2002; Stahl et al., 2002).

La fagocitosi dels bacteris per part dels macròfags és un mecanisme de defensa important de l'organisme contra agents patògens. El contacte amb bacteris o amb components bacterians indueix l'increment dels nivells de BIM als macròfags, que els porta a la mort per apoptosi (Kirschnek et al., 2005) Quan les cèl·lules epitelials es desenganxen, s'indueixen ràpidament els nivells de BIM, pel que, almenys en aquest model, BIM és un mediador crític per desencadenar el procés d'*anoikis* (Reginato et al., 2003).

3. LA FAMÍLIA DE IAPs.

La família de gens inhibidors de l'apoptosi, les IAPs (de *Inhibitor of apoptosis proteins*), constitueixen una família molt conservada de proteïnes, trobada en organismes tan diversos com insectes i mamífers. Aquests gens, codifiquen per proteïnes que s'uneixen directament a les caspases i les inhibeixen, jugant un paper clau en les decisions del destí de la cèl·lula. Alhora, les IAPs estan regulades per una sèrie de proteïnes endògenes, moltes de les quals són alliberades del mitocondri durant l'apoptosi. En molts tipus de tumor o de línies cel·lulars derivades de tumor sembla freqüent la sobreexpressió d'una o més IAPs. L'amplificació gènica i les translocacions dels gens de les IAPs són evidències genètiques per reforçar la classificació de les proteïnes IAPs com oncogens.

La família de proteïnes IAPs es caracteritza per tenir un o més dominis BIR (de *baculoviral IAP repeat*), que són dominis de 70-80 aminoàcids. Les primeres proteïnes amb dominis BIR van ser identificades als Baculovirus, i des de llavors s'han trobat a diferents espècies, incloent diferents espècies de llevats, com *Saccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae*, el nemàtode *C. elegans*, la mosca *Drosophila*, fins a vertebrats. L'expressió ectòpica d'algunes de les IAPs virals a cèl·lules de mamífer bloquegen l'apoptosi, el què indica el manteniment d'aquestes proteïnes i el seu mecanisme d'acció entre les diferents espècies. La funció de les proteïnes IAPs és la d'actuar com a inhibidors endògens de les caspases, així com, la de participar a la

regulació del cicle cel·lular i a la modulació dels senyals de transducció mediats per receptor. La identificació de proteïnes amb dominis BIR a organismes unicel·lulars com els llevats, que no posseeixen un programa apoptòtic com a tal, ha fet que es necessités una definició més acurada de les IAPs, més enllà, de només tenir els dominis BIR. La llarga llista de proteïnes amb dominis BIR, anomenades BIRPs (de *BIR-containing proteins*), es divideixen en dues subfamílies; (i) les IAPs, que tenen un o més BIRs i tenen activitat antiapoptòtica; (ii) i un altre subgrup de proteïnes que en general solen tenir un sol domini BIR i tenen altres funcions a la cèl·lula, diferents a l'apoptosi, com la de regular la citocinesi i la segregació de la cromatina, i en alguns casos, possibles papers secundaris en la regulació de l'apoptosi.

3.1. MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE LES IAPs.

La primera IAP descoberta a mamífers va ser NAIP (de *neural apoptosis inhibitory protein*), identificada en l'intent d'aïllar el gen implicat en la malaltia de l'atròfia muscular espinal (Roy et al., 1995), que codifica per tres dominis BIR i un domini NOD (de *nucleotide-binding oligomerization domain*) al seu extrem carboxi-terminal. Després es van anar identificant tota la resta de membres cel·lulars, com c-IAP-1, c-IAP-2, i XIAP, que totes tres contenen tres dominis BIR i un RING-*finger* al seu extrem carboxi-terminal (Liston et al., 1996). La família continua amb la identificació de la survivina, amb un sol domini BIR (Ambrosini et al., 1997), Livin, amb un sol BIR i un RING-*finger* al seu extrem carboxi-terminal (Vucic et al., 2000) i una IAP amb expressió restringida a testicle, Ts-IAP, amb un sol BIR i un RING-*finger* al seu extrem carboxi-terminal (Lagace et al., 2001; Richter et al., 2001). A la Figura-110 es poden veure els diferents membres de la família de IAPs i els seus dominis.

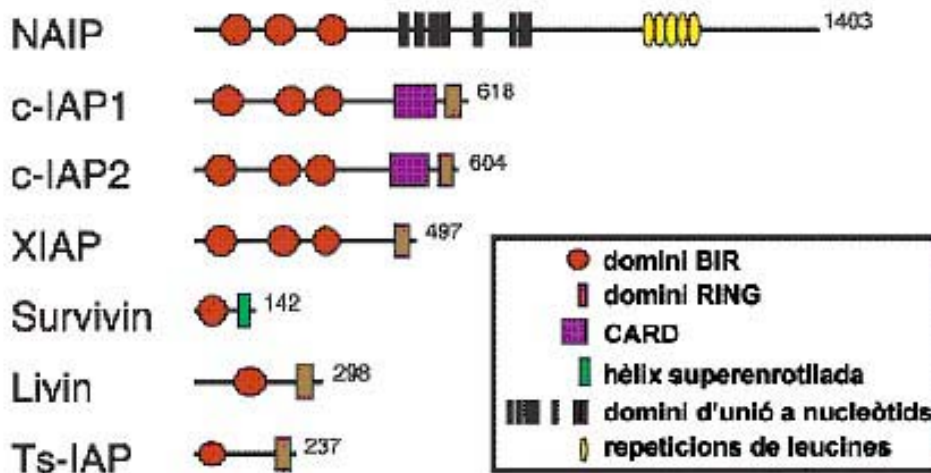


FIGURA-110. Els diferents membres de la família de IAPs en vertebrats amb els principals dominis de cada una (Modificat de Liston et al., 2003).

3.2. FUNCIONS DE LES IAPs.

Totes les IAPs semblen inhibir les mateixes caspases, la caspasa-3, -7 i/o -9, tot i que, les seves afinitats varien. Aquesta aparent redundància, ignora aspectes crítics d'expressió i localització subcel·lular de les IAPs, que fan que cada una tingui una funció específica. La IAP més diferent sembla ser la survivina, que restringeix la seva expressió al punt G2/M del cicle cel·lular, i és l'única IAP associada a estructures de cromatina, on sembla controlar la replicació dels cromosomes i la supressió de l'activitat caspasa al nucli (Li et al., 1998a). La Livin també s'ha trobat al nucli, però no sembla estar regulada pel cicle cel·lular ni sembla estar associada a cap estructura nuclear. S'ha hipotetitzat que Livin podria tenir la funció d'evitar l'activació accidental de caspases al nucli (Kasof i Gomes, 2001). Ts-IAP és una còpia autosòmica retrotransposada sense introns d'XIAP, i s'expressa restringidament als testicles (Lagace et al., 2001), que igual que altres gens amb expressió restringida en aquest òrgan, podria ser per compensar la inactivació del cromosoma-X durant l'espermatogènesi, tot i que encara no es coneix la seva funció. Menys clara és la necessitat de les múltiples còpies de les IAPs amb tres dominis BIR (NAIP, c-IAP-1, c-IAP-2 i XIAP), que tenen activitats semblants, encara que tenen una distribució tissular diferent (Yang i Li, 2000a).

Dominis de les IAPs.

El domini BIR és la unitat funcional millor caracteritzada de les IAPs. Cada domini BIR és una estructura funcionalment independent, que quela un ió de zinc, i és el responsable de la majoria d'interaccions que fan les IAPs, inclosa la unió a les caspases. Com a regla general, a les IAPs on hi ha múltiples BIRs, el tercer domini BIR inhibeix la caspasa-9, i el segon domini BIR inhibeix la caspasa 3 i 7. Pel que fa a les IAPs amb un sol domini BIR, la Ts-IAP inhibeix la caspasa-9 (Richter et al.,2001), el BIR de la survivina inhibeix les caspases 3 i 7, mentre que el BIR de la Livin inhibeix les tres caspases. Tot i la similitud estructural entre els dominis BIR, el mecanisme d'inhibició de caspases difereix significativament entre els dominis BIR2 i BIR3. Estudis cristal·logràfics del domini BIR2 d'XAIP amb la caspasa 3 i 7, han revelat que la regió d'unió pròxima a BIR2 (entre els dominis BIR 1 i 2) és més important per la interacció que el propi BIR2. La caspasa-3 estaria inhibida per la regió d'unió entre els dominis BIR1 i 2, mentre que la caspasa-7 estaria inhibida per la combinació de la regió d'unió entre els dominis BIR1 i 2 més el domini BIR2 (Chai et al., 2001). El domini BIR1, el menys conservat, no té activitat inhibidora de caspases, però la seva existència i conservació segurament implica una funció específica, encara pendent de ser identificada.

Els dominis de dits de zinc RING (RZFs) se solen trobar als extrems amino-terminals de proteïnes que funcionen com E3-ubiquitina lligases, marcant les proteïnes per ser degradades al proteasoma. L'estudi d'aquests dominis en c-IAP-1 i XIAP indica que aquests motius provoquen la ubiquitinització i degradació de les IAPs en resposta als estímuls apoptòtics, com el tractament amb glucocorticoids i etoposide. Altres estudis demostren que c-IAP2 i XIAP poden ubiquitinitzar les caspases 3 i 7, i a Smac/Diablo, un antagonista de les IAPs (Liston et al, 2003), suggerint un altre mecanismes antiapoptòtics de les IAPs. El domini CARD (de *caspase recruitment domain*) permet l'oligomerització amb altres proteïnes que contenen dominis CARD, així com també promou l'homodimerització. La proteïna NAIP conté un domini NOD a l'extrem carboxi-terminal que podria afavorir l'associació amb ella mateixa o amb altres proteïnes.

A més d'inhibir les caspases i de l'activitat E3-ubiquitina, s'ha vist que XIAP també intervé en les vies de transducció de senyals. Mitjançant el domini BIR, XIAP es pot unir a la proteïna adaptadora TAB1, que pot reclutar el complex receptor TAK1, que pot activar les vies de senyalització d'NFκB i JNK1, mentre que el domini RING carboxi-terminal es pot unir a la cua citoplasmàtica del receptor de BMP (de *bone morphogenic protein*) (Liston et al., 2003). Dues de les IAPs, c-IAP-1 i c-IAP-2, són

components del complex proteic que es forma a la cua citoplasmàtica del receptor-2 del TNF α ; aquesta unió no és directa, i és mediada per dues proteïnes addicionals, TRAF1 i TRAF2 (Shu et al., 1996; Liston et al., 2003). La formació de complexos alternatius que involucren a membres de TRAF i de IAPs afavoreixen l'activació d'NF κ B, que pot activar transcripcionalment gens de supervivència, inclosos c-IAP-1, c-IAP-2 i XIAP (Lee i Collins, 2001).

Les IAPs són substrats de les pròpies caspases.

A més d'inhibir les caspases, s'ha demostrat que XIAP i c-IAP-1 poden ser substrats d'aquestes caspases. L'apoptosi desencadenada per una gran varietat d'estímuls dóna lloc a l'aparició d'un fragment proteolític d'XIAP. S'ha proposat un model on el processament d'XIAP causaria la separació de la proteïna en dues regions, que permetria una acció independent sobre les caspases. No obstant, aquest processament es veu majoritàriament en cèl·lules en procés d'apoptosi avançat, quan les característiques bioquímiques i morfològiques de l'apoptosi ja s'han donat, pel que sembla més una característica del procés d'apoptosi que no un mecanisme de protecció de la cèl·lula (Deveraux i Reed, 1999).

3.3. Reguladors negatius de la funció de les IAPs.

S'han identificat tres proteïnes que s'uneixen a les IAPs i suprimeixen la seva activitat: (i) XAF1 (d'XIAP associated factor), que és una proteïna nuclear capaç d'induir la redistribució d'XIAP del citosol al nucli i unir-s'hi, interferint amb la inhibició de la caspasa-3 (Liston et al., 2001). XAF1 està ubiqüament expressat en tots els teixits normals analitzats, però es troba en nivells molt baixos a la majoria de línies cel·lulars transformades analitzades (Fong et al., 2000); (ii) Smac/DIABLO (de Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) es troba al mitocondri d'on és alliberada i processada després d'un estímul apoptòtic, amb una cinètica semblant a la del citocrom-c. Encara no està ben resolt el mecanisme d'alliberació d'Smac, ja que el tractament de les cèl·lules apoptòtiques amb inhibidors de caspases permet l'alliberament del citocrom-c (d'aproximadament 12 KDa), però bloqueja l'alliberament d'Smac (d'aproximadament 100 KDa), el que suggereix mecanismes diferents de sortida. S'ha demostrat que la proteïna Smac és capaç d'unir-se a totes les IAPs, i tant al domini BIR2 com BIR3 d'XIAP, interferint en la unió de les caspases 3/7 i de la

caspara 9 (Du et al., 2000); (iii) Omi/HtrA2 (de proteïna HtrA induïble per *heat-shock*), com l'Smac, és alliberada del mitocondri i processada en les cèl·lules apoptòtiques, permetent una unió directa a XIAP, inhibint la seva unió a les caspases (Suzuki et al., 2001). Per homologia a la proteasa HtrA2 d'*Escherichia coli*, es pensa que la proteïna Omi/HtrA2 humana podria estar involucrada en la degradació de proteïnes mal plegades sota condicions d'estrès cel·lular. A la Figura-111 es simplifica una visió general de tot el procés de mort cel·lular programada i com es donaria l'activació de les caspases, la funció de les IAPs i la dels seus reguladors negatius.

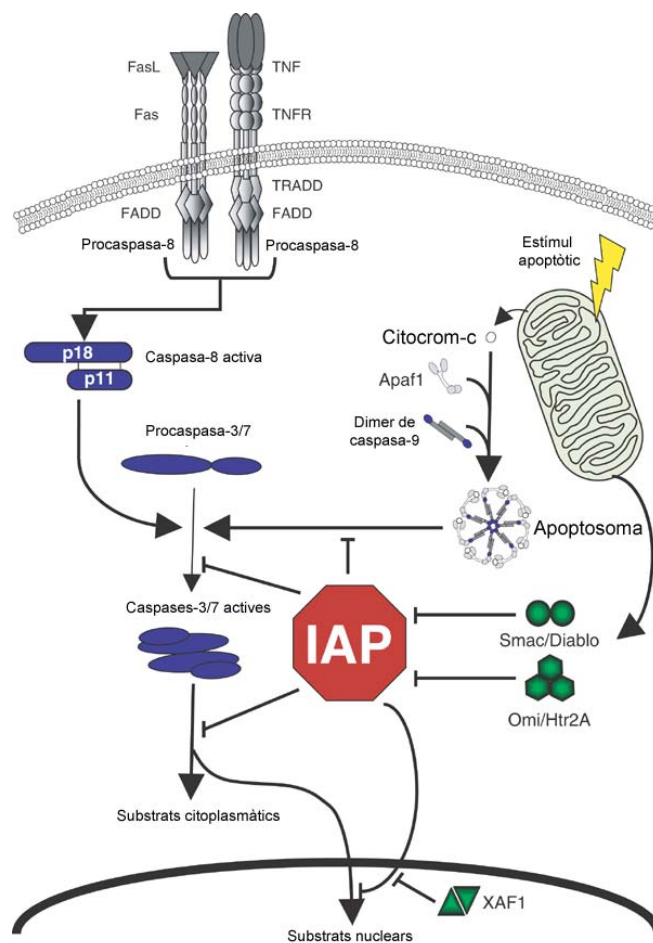


FIGURA-111. Funció de les IAPs durant l'apoptosi. L'activació dels receptors de la mort activa la caspasa-8 i aquesta les caspases efectores-3/7 desencadenant l'apoptosi. Un senyal apoptòtic a través de la via endògena dispara l'expressió i/o activació d'algun membre proapoptòtic de Bcl-2 que desencadenarà l'alliberament del citocrom-c del mitocondri, activant les caspases. Els nivells de IAPs determinarà el destí cel·lular; uns nivells alts d'XIAP (o baixos nivells de XAF1) suprimirien l'activació de la caspasa-9, i evitaria l'activació de les caspases efectores. Si això no es pot evitar i es dona l'activació de suficient caspasa-9, s'activaran les caspases 3 i 7. L'activació de les caspases incrementaria la permeabilització de la membrana, que permetria l'alliberament d'Smac i d'Omi (Modificat de Liston et al., 2003).

3.4. XIAP i la seva regulació traduccional.

El cas més especial de totes les IAPs és el d'XIAP, que té una síntesi proteica controlada per un sistema exclusiu. El transcrit d'*xiap*, expressat a tots els teixits a nivells bastant constants, és molt gran (d'aproximadament 9 Kilobases), tot i que la regió codificant és de només 1,5 Kb. La regió 5'-no traduïda del gen (5'-UTR de *untranslated region*) és molt gran (almenys de 1,6 Kb); això sol ser poc habitual en eucariotes, ja que és difícil que el ribosoma pugui fer un *scanning* convencional per trobar el codó on ha de començar la traducció. S'ha demostrat que aquesta regió conté un element IRES (de *internal ribosome entry site*) (Holcik et al., 1999). Els elements IRES van ser identificats en picornavirus, que són capaços d'aturar la síntesi proteica de la cèl·lula a la que infectaven mitjançant la inactivació de factors necessaris per la traducció CAP-dependent. Els elements IRES són capaços de reclutar els ribosomes directament en el punt d'inici de la traducció, el què permet als missatgers vírics traduir-se independentment de la maquinària de síntesi proteica convencional CAP-dependent. Els elements IRES en gens eucariotes són poc abundants, però se n'han identificat en alguns oncogens i en factors de creixement (Holcik et al., 2000), tot i que hi ha autors que neguen l'existència d'aquests en cèl·lules eucariotes (Kozak, 2001). Així, l'element IRES d'XIAP permetria la síntesi proteica del gen en condicions d'estrès cel·lular on la traducció CAP-dependent estaria aturada, ja que alguns dels factors necessaris per fer-la són substrats de caspases. D'aquesta manera, XIAP podria permetre sobreviure a la cèl·lula durant un període breu de temps.

4. LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B.

La leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B (LLC-B) va ser caracteritzada per primera vegada l'any 1966, com una malaltia on es dona un augment progressiu del número de limfòcits B monoclonals, de petita mida, funcionalment inerts, amb baixa capacitat de multiplicació i una vida mitja molt llarga. Tot això fa que s'acumulin a l'organisme, preferentment a la sang perifèrica, al moll de l'os i als ganglis limfàtics (Galton, 1966; Dameshek, 1967). Aquests limfòcits tenen una aparença madura, però tenen una producció deficient d'anticossos, que afavoreix l'aparició de processos infecciosos (Montserrat, 1997). Els limfòcits B circulants dels pacients que pateixen leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B, són cèl·lules de tipus B1 que es troben aturades en fase G₀ del cicle cel·lular i que responen dèbilment als estímuls mitogènics, mentre que les cèl·lules B normals són de tipus B2 (Montserrat i Rozman, 1995).

4.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B.

La LLC-B és una malaltia comuna dels països occidentals desenvolupats, on representa el 30% de totes les leucèmies i el 75% de les cròniques, mentre que en la població dels països asiàtics representa el 3-5% del total de leucèmies diagnosticades (Montserrat i Rozman 1995). Cada any, es diagnostiquen entre 7.000 i 10.000 pacients als Estats Units i a Europa, i anualment moren unes 5.000 persones per aquesta malaltia en aquests països (Pangalis, et al., 2002). La incidència mitjana de la LLC-B és d'aproximadament 3 casos per 100.000 habitants l'any. La LLC-B es manifesta majoritàriament en individus de mitjana i avançada edat, essent els 65 anys l'edat mitjana de diagnosi, i rarament es presenta en individus menors de 45 anys. Tot i que encara no es coneixen els motius, hi ha una afectació diferent de la malaltia respecte la incidència per sexes, ja que afecta dos homes per cada dona (Salar et al., 1997; Oscier et al., 2004).

4.1.1. Diagnòstic.

La LLC-B s'acostuma a diagnosticar en estadis molt primerencs de la malaltia, quan els pacients van al metge afectats per problemes lleus, com malestar lleuger, cansament i certs problemes respiratoris durant l'exercici. Un dels principals criteris per al diagnòstic de la malaltia és la determinació de la quantitat absoluta de limfòcits i l'aparència d'aquests. Cal detectar una limfocitosi absoluta, no transitòria, en sang perifèrica (15×10^9 cèl·lules / L) acompanyada d'infiltració limfocitària (>30%) en el moll de l'os. La morfologia dels limfòcits B és característica, ja que tot i tenir una aparència madura, són de petita mida, i tenen la cromatina nuclear condensada i separada per franges cromàtiques més clares. La majoria del volum cel·lular és ocupat pel nucli, pel que tenen una elevada relació nucli/citoplasma (Woessner et al., 1991). Són cèl·lules fràgils, que es trenquen fàcilment durant l'extensió de frotis, adquirint al microscopi l'aspecte de taca (ombres de Gumprecht) A la Figura-112 es pot apreciar la morfologia de les cèl·lules perifèriques de LLC-B.

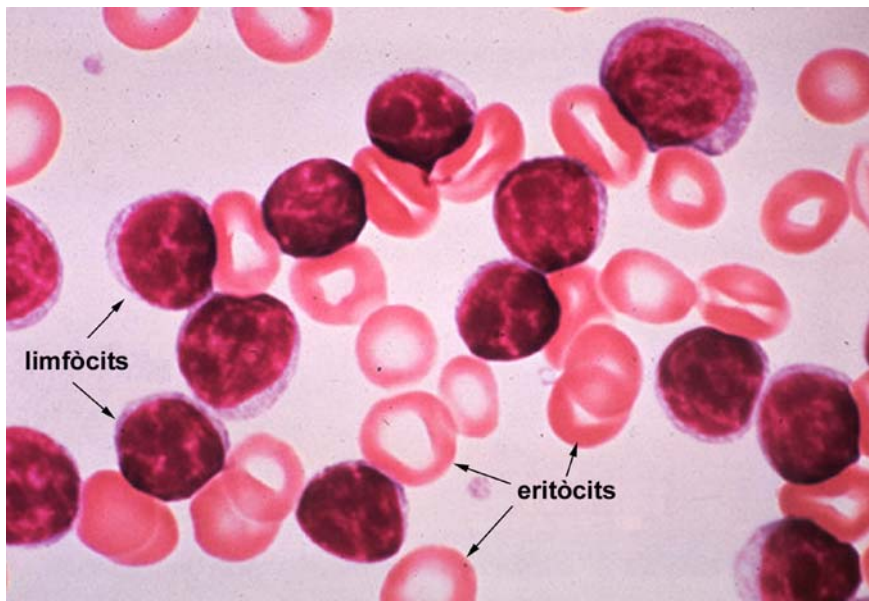


FIGURA-112. Morfologia de les cèl·lules de LLC-B en sang perifèrica.

Actualment, el diagnòstic de la LLC-B es realitza determinant les característiques immunofenotípiques de la població B acumulada a la sang perifèrica (Oscier et al., 2004), que es tracta d'una població :

- Població monoclonal de cèl·lules que expressen simultàniament en la seva superfície els marcadors CD5 (que és un antigen de les cèl·lules T), CD19, CD20 i CD23 (Jennings i Foon, 1997).

- Baixa densitat d'immunoglobulines de superfície, normalment sIgM i/o sIgD (constituïdes per un sol tipus de cadena pesada i un sol tipus de cadena lleugera, el que indica la seva monoclonalitat) (Rozman i Montserrat, 1995).
- Els limfòcits formen rosetes amb eritròcits de ratolí (Forbes i Zalewski, 1976).

El fet que les cèl·lules de LLC-B expressin el marcador CD5 a la seva superfície, fa pensar que el seu origen pot ser el mateix que el de les cèl·lules CD5⁺ que es produeixen als primers estadis del desenvolupament embrionari. Aquestes cèl·lules es troben en elevada proporció en els nounats i coexpressen gran quantitat d'antígens de diferenciació (Kontny et al., 1994), però sense presentar hipermutacions a la regió variable de les immunoglobulines (IgV), que és característic de la LLC-B (Oscier et al., 1997). Segons l'anàlisi comparatiu del patró d'expressió de diversos gens en diferents models cel·lulars mitjançant *microarrays*, que permeten determinar l'expressió de milers de gens i comparar-los, s'ha determinat que les cèl·lules de LLC-B són més semblants a les cèl·lules B de memòria que a les cèl·lules B CD5⁺ que no han passat pel centre germinal (Alizadeth et al., 2000; Klein et al., 2001; Rosenwald et al., 2001). L'any 2002 es van descriure els ratolins transgènics E μ -TCL1 que presenten una expansió de limfòcits CD5⁺ i poden desenvolupar una leucèmia semblant a la LLC-B humana (Bichi et al., 2002)

4.1.2. Citogenètica i anormalitats oncogenètiques.

Qualsevol tipus de càncer, es caracteritza per una sèrie d'alteracions citogenètiques o mutacions al DNA, que són el detonant que la cèl·lula esdevingui tumoral. Al nostre model d'estudi, s'han caracteritzat una sèrie d'alteracions cromosòmiques i mutacions, que es presenten a la Taula-I3.

Alteració	Incidència	Efecte
Delecions 13q14	~50%	Inactivació d'un possible gen supressor de tumors.
Trisomia del 12	~35%	Possible protooncogen.
Delecions 11q22	~20%	Inactivació d'un possible gen supressor de tumors.
Alteracions 17p	~5%	Inactivació de p53.
Translocacions 18q21	~1-4%	Activació de Bcl-2.

TAULA-I3. Alteracions citogenètiques més freqüents en LLC-B (modificat de Reed, 1998; Stankovic et al., 1999).

- Delecions 13q14: la proteïna del Retinoblastoma (RB-1) es troba codificada en un locus proper del lloc delecionat, tot i que no sembla ser el gen implicat en la LLC-B (Bullrich et al., 1996). Els gens que es troben al lloc delecionat són *leu2* i *leu5*, que podrien ser possibles supressors tumorals (Kapanadze et al., 2000; Migliazza et al., 2001).
- Trisomia del 12: s'ha detectat en cèl·lules mare hematopoiètiques CD34⁺ a pacients de LLC-B, el què suggereix un defecte genètic a l'origen de les cèl·lules.
- Delecions 11q22: és on es troben els gens *atm* (d'atàxia telangiectàsia mutada), *radixina* i *ferrodoxina 1* (Döhner et al., 1997). A més, s'han descrit mutacions d'*atm* a l'al·lel no delecionat i en casos familiars de LLC-B sense delecio 11q22 (Bullrich et al., 1999; Stankovic et al., 1999).
- Mutacions del gen *p53* (17q): el gen p53 és un gen supressor de tumors, i és el gen més mutat dels diferents tipus de càncer. S'han detectat mutacions de p53 en el 10% de casos de LLC-B, i estan associades a la progressió de la malaltia, la resistència a la quimioteràpia i a la transformació de la LLC-B a limfoma difús de cèl·lules grans o síndrome de Richter (Fenaux et al., 1992; Newcomb, 1995).
- Translocacions 18q21: la translocació t(14;18)(q32;q21), que va ser descrita per primer cop al limfoma folicular, provoca la deslocalitació del gen *bcl-2* posant-lo sota control de potenciadors presents als promotors de les immunoglobulines (Tsujiimoto et al., 1984a, 1984b). Tot i que la gran majoria de pacients de LLC-B (70%) presenten nivells alts de la proteïna Bcl-2, no sembla que la causa d'això sigui la translocació del gen, ja que és un procés que es detecta en molt pocs casos (1-4%). Una hipòtesi per explicar la sobreexpressió de Bcl-2 a les cèl·lules de LLC-B és la hipometilació del locus de Bcl-2 (Hanada et al., 1993).

Recentment s'ha descrit la presència d'unes insercions de 6 o 18 nucleòtids al promotor d'*Mcl-1* en malalts de LLC-B (en un 30 %), i que no es trobarien presents en la població no leucèmica. Aquestes insercions podrien estar associades a increments dels nivells de missatger i proteïna, a la resistència a la quimioteràpia i a un mal pronòstic en la progressió de la malaltia (Moshynska et al., 2004).

4.1.3. Classificació dels estadis de la LLC-B i pronòstic.

Dins del terme LLC-B s'engloben una sèrie de pacients afectats per una mateixa malaltia, però amb una expressió clínica molt variable, que va des de formes indolents d'evolució molt lenta, fins a formes molt agressives d'evolució ràpida. Per tal de diferenciar l'estadi de la malaltia en què es troba cada malalt, s'han definit una sèrie de criteris clínics i de diagnòstic, que permeten fer el pronòstic del pacient i donar en cada cas el tractament específic més adient. Actualment, els dos criteris utilitzats per classificar els estadis de la LLC-B són el de Rai (Rai et al, 1975) i Binet (Binet et al., 1981).

S'han establert nous criteris per la determinació del pronòstic de la LLC-B, independents i complementaris a la classificació en estadis clínics. L'avenç més important en la determinació del pronòstic de la LLC-B és la determinació de l'estat mutacional de les immunoglobulines (IgV_H). Podem classificar els pacients de LLC-B en dos subtipus, M i UM. El subtipus M (*mutated*, mutat) són pacients que tenen més del 2% de la seqüència de nucleòtids diferent de les cèl·lules germinals, i el subtipus UM (*unmutated*, no mutat) són pacients amb una diferència menor del 2%. Els pacients UM tenen una supervivència de mitjana d'entre 8 i 9 anys, molt menor que els pacients del grup M on la supervivència mitjana s'allarga fins als 24 anys. La determinació de l'estat mutacional de les IgV_H no és aplicable a la clínica per la seva complexitat i cost, per això s'han cercat marcadors que correlacionin amb l'estat mutacional de les immunoglobulines. En un primer moment es va correlacionar el marcador de membrana CD38 amb UM, però actualment el marcador ZAP-70 és més fiable. ZAP-70 (*zeta-associated protein 70*), és una tirosina-quinasa necessària per la transducció del senyal del TCR, que normalment s'expressa en limfòcits T. ZAP-70 s'expressa en quasi el 100% dels pacients de LLC-B del subtipus UM i només en el 10% dels casos M (Chen et al., 2002b; 2005a). El gran avantatge és que la seva detecció és senzilla mitjançant citometria de flux.

4.2. TRACTAMENT DE LA LLC-B.

Degut a que la LLC-B és una malaltia que afecta a una població amb edat avançada i té una progressió normalment lenta, se sol tractar d'una manera conservadora, amb l'objectiu d'alentir la progressió de la malaltia i alleujar els símptomes.

4.2.1. Tractament convencional.

El tractament se sol iniciar quan es dóna alguna evidència del progrés de la malaltia, com un increment de les masses limfàtiques, pèrdua progressiva dels nivells d'hemoglobina o plaquetes, adenopatia severa, esplenomegàlia, anèmia i/o trombocitopènia severes, augment en el recompte absolut de limfòcits en sang ($>150-200 \cdot 10^9$ cèl·lules/L) o recomptes inferiors acompanyats d'una alta taxa de duplicació, infiltració medul·lar difusa o complicacions autoimmunes com la anèmia hemolítica Coomb positiva o la trombocitopènia immune (Cheson et al.,1996; Montserrat, 1997). En alguns casos s'ha observat l'aparició de malalties secundàries i de leucèmies agudes derivades del tractament, com la transformació de la LLC-B en el síndrome de Richter (limfoma difús), que pronostica un pitjor pronòstic pels pacients.

Actualment, les opcions terapèutiques són molt variades, i inclouen des del tractament amb drogues antineoplàsiques i anticossos monoclonals, fins al transplantament de medul·la òssea. A la Taula-14 es resumeixen els principals fàrmacs utilitzats en la teràpia de la LLC-B.

Tipus fàrmac	fàrmac
Glucocorticoids	Prednisona
Agents alquilants	Clorambucil, ciclofosfamida, melfalan
Anàlegs de purines	Fludarabina, 2-clorodeoxiadenosina, desoxicofuridina
Inhibidors topoisomerasa II	Doxorubicina, mitoxantrona
Anticossos monoclonals	Rituximab, CAMPATH-1H
Inhibidor fus mitòtic	Vincristina
Teràpia antisentit	
Combinacions fàrmacs	
COP	Ciclofosfamida + Vincristina + Prednisona
CAP	Ciclofosfamida + Doxorubicina + Prednisona
CMP	Ciclofosfamida + melfalan + Prednisona
CHOP	Ciclofosfamida + Doxorubicina + Vincristina + Prednisona
FCM	Fludarabina + ciclofosfamida + mitoxantrona
Fludarabina + Rituximab	
Fludarabina + CAMPATH-1H	

Taula-14. Principals fàrmacs i combinacions de fàrmacs, utilitzats en la teràpia de la LLC-B (de la Tesi Doctoral de Clara Campàs, 2004).

La quimioteràpia és la primera opció terapèutica pels malalts de LLC-B. Durant les dues darreres dècades, el clorambucil, un agent alquilant, ha estat el tractament d'elecció, sol o combinat amb altres drogues. Actualment, els anàlegs de purina, com la fludarabina i la 2-clorodeoxiadenosina, són els tractaments més habituals per la malaltia. Es tracta de fàrmacs amb altes taxes d'efectivitat quan s'utilitzen com a tractament de primera línia, però en molts tumors apareixen resistències. Els anàlegs de purines i les seves combinacions assoleixen graus de resposta millors que el clorambucil, però això no es tradueix en una millora en la supervivència a llarg termini (Kitada et al., 2002; Andritsos i Khoury, 2002).

Els anàlegs de nucleòsids, afecten la integritat estructural del DNA, per incorporació a la cadena durant la replicació o la reparació, que és reconegut per diferents sensors que fan que es produeixi una parada del cicle cel·lular i s'activin els mecanismes de reparació si el dany és reparable, o bé s'activin les vies que condueixen a l'apoptosi si el dany és irreparable (Pettitt, 2003). A les cèl·lules proliferants, la fludarabina s'incorpora al DNA durant la replicació i provoca la terminació de la cadena. Però aquest efecte sembla menys evident en cèl·lules quiescents, on s'ha demostrat que pot incorporar-se també al RNA i aturar la transcripció (Huang et al., 2000). Això s'associa a la caiguda dels nivells de proteïnes antiapoptòtiques de vida mitja curta, com Mcl-1 i XIAP (Kitada et al., 1998), i a la inducció d'apoptosi. De forma directa o indirecta, el fàrmac provoca un augment d'ATP, que podria estar augmentant l'activitat de l'apoptosoma. A les cèl·lules quiescents s'ha descrit també la incorporació dels anàlegs de purines al DNA durant el procés de reparació, pel què aquest fenomen té especial importància en la combinació d'aquests fàrmacs amb agents alquilants, com el clorambucil o la ciclofosfamida (Sampath et al., 2003).

Els anticossos monoclonals desenvolupats en els últims anys, són una nova opció terapèutica, que a diferència dels fàrmacs convencionals, permet una major especificitat i selectivitat per les cèl·lules tumorals, ja que normalment van dirigits contra marcadors de membrana específics de les cèl·lules tumorals. Alguns exemples d'anticossos monoclonals utilitzats en la teràpia de la LLC-B són el Rituximab i el Campath-1, dirigits cap els marcadors de membrana CD20 i CD52 respectivament (Byrd et al., 2002; 2003; Rai i Halleck, 2002).

4.2.2. Problemes de la teràpia actual i nous tractaments.

Un dels principals efectes adversos de la teràpia convencional és la immunosupressió i l'aparició de resistències al tractament. Actualment, els investigadors focalitzen els esforços en la recerca de nous agents quimioterapèutics que siguin més selectius per

dianes moleculars concretes, i superin la limitada eficàcia i els efectes paral·lels no desitjats de la teràpia convencional. Estratègies prometedores per minimitzar la mort cel·lular s'han centrat en els inhibidors de les caspases, mentre que les estratègies per incrementar la mort cel·lular s'han dirigit cap a les famílies de Bcl-2 i de les IAPs, i en activar les vies dels receptors de la mort. Les IAPs són ara per ara unes dianes terapèutiques molt prometedores en les "dues cares de la moneda". Quan són sobreexpressades, les cèl·lules esdevenen resistents als estímuls apoptòtics (per exemple en el tractament de malalties neurodegeneratives), i quan són inhibides, les cèl·lules es sensibilitzen a la mort (com per exemple a la teràpia contra el càncer). Els nous tractaments per la LLC-B es basen en el disseny de molècules dirigides contra dianes específiques, com la inhibició de les vies de PI3K/Akt i PKC, inhibició de fosfodiesterases, inhibició de les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2, inhibició de FILP, la síntesi de nous retinoids i el disseny d'anticossos monoclonals contra CD23, CD22 i CD25 (Johnson et al., 2003; Kipps, 2003; Mavromatis i Cheson, 2004).

També s'actua sobre les proteïnes implicades en l'apoptosi mitjançant la teràpia antisentit, o la immunoteràpia, basada en l'estimulació de la resposta immunitària a les cèl·lules tumorals mitjançant vacunes, o en la utilització de cèl·lules T activades (Keating et al., 2003). La manera més eficaç d'eliminar la funció dels membres de Bcl-2 és mitjançant la síntesi de petites molècules sintètiques que mimetitzin la interacció del domini BH3 dels BH3-only amb els membres antiapoptòtics. Moltes de les cèl·lules tumorals han acumulat múltiples defectes en reguladors clau del cicle cel·lular, com p53, pel que no es poden induir ni Noxa ni Puma. Amb aquests mimètics del domini BH3, es pot sobrepassar la regulació de p53 sobre aquests gens, possibilitant la inhibició dels membres antiapoptòtics (Cory et al., 2003; Chen et al., 2005b) (Figura-113). S'ha demostrat que la depleció dels nivells d'Mcl-1 és suficient per promoure l'apoptosi en certs models cel·lulars, pel que és una bona diana per a noves teràpies antitumorals mitjançant aquesta estratègia d'inhibició. S'ha descrit que la resistència al tractament amb glucocorticoids en els pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda, és deguda a que no són capaços d'induir BIM, sense estar alterada la quantitat de receptor de glucocorticoids o la capacitat d'unió del lligand al receptor (Bachman et al., 2004). Per tant, el disseny de petites molècules sintètiques que mimetitzin l'acció de BIM són agents terapèutics molt prometedors.

El transplantament de cèl·lules precursors és una alternativa a la quimioteràpia, especialment en els pacients de menys de 65 anys que han respost a fludarabina i/o

Rituximab (Polliack, 2003), tot i que la quimioteràpia segueix sent el tractament majoritari per a la LLC-B.

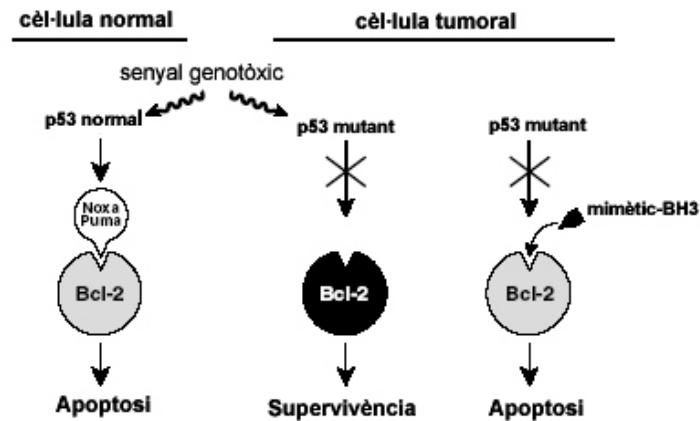


FIGURA-113. Potencial terapèutic dels mimètics del domini BH3. A una cèl·lula normal els senyals genotòxics fan activar Noxa i Puma que poden bloquejar els membres antiapoptòtics, disparant el procés de mort. Les cèl·lules tumorals amb *p53* mutat no poden activar aquests gens, pel que esdevenen resistents als senyals de mort, ja que tenen Bcl-2 funcional. Els mimètics del domini BH3 es poden unir a la butxaca de Bcl-2 inhibint-lo, de la mateixa manera que ho fan els membres proapoptòtics, disparant el procés d'apoptosi (Modificat de Cory et al., 2003).

4.3. PRINCIPALS VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS IMPLICADES EN LA REGULACIÓ DE L' APOPTOSI I SUPERVIVÈNCIA DE LA LLC-B.

Tota cèl·lula, ha de prendre un seguit de decisions al llarg de la seva existència per tal de determinar el seu destí o respondre a diferents senyals extracel·lulars, de diferenciació, proliferació, quiescència o mort. Els factors externs que rep una cèl·lula són interpretats i integrats, i faran desencadenar l'activació d'una complexa xarxa de vies de transducció de senyals, on participaran un gran nombre de proteïnes de manera seqüencial i específica de cada senyal, que portaran a activar la transcripció de nous gens, que faran que la cèl·lula doni una resposta determinada per cada senyal. L'estudi de la xarxa de vies de transducció de senyals involucrades en la supervivència de les cèl·lules de LLC-B, és de vital importància per la teràpia de la malaltia, i perquè es puguin desenvolupar nous fàrmacs més efectius (Barragán et al., 2003). S'han implicat diferents factors de supervivència en la prevenció de l'apoptosi dels limfòcits de LLC-B *ex vivo*, entre els què destaquen la interleucina-4 (IL-4), l'interferó- γ (IFN- γ), la IL-2, la IL-6, la IL-8, la IL-13, el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) i el factor SDF-1 (de *stromal cell-derived factor-1*). Les principals vies de transducció de senyals implicades en la regulació de la supervivència i l'apoptosi de la LLC-B són:

4.3.1. Via de la PKC.

La família d'isoenzims coneguda col·lectivament com a proteïna quinasa-C (PKC, de *Protein Kinase C*) s'agrupa en 3 subclasses: clàssiques, noves i atípiques (Mellor i Parker, 1998). Són proteïnes amb activitat serina/treonina-quinasa. Els èsters de forbol (com el TPA) i les briostatines són activadors selectius de les PKCs clàssiques i noves, que produeixen un descens en el número de cèl·lules apoptòtiques, tant en l'apoptosi espontània de les cèl·lules de LLC-B com en la induïda amb drogues (McConkey et al., 1991; Forbes et al., 1992; Robertson et al., 1993; Bellosillo et al., 1997; Kitada et al., 1999). La inhibició de la PKC amb diferents inhibidors, com el BisI (bisindolylmaleimide I), induïx apoptosi a les cèl·lules de LLC-B, indicant que hi ha sempre una activitat basal d'aquesta via en les cèl·lules LLC-B, i és fonamental per a la supervivència d'aquestes (Barragán et al., 2002).

4.3.2. Via de la PI3K/Akt.

Les cèl·lules de LLC-B tenen constitutivament activada la via de la PI3K (de *phosphatidylinositol 3-kinase*). Els inhibidors selectius de la PI3K, LY294002 i wortmanina, induïxen apoptosi en les cèl·lules de LLC-B. Aquesta via juga un paper molt important en la supervivència induïda per IL-4 (Barragán et al., 2002), suggerint que altres citocines que inhibeixen l'apoptosi a les cèl·lules de LLC-B podrien estar induïnt l'activació de PI3K, tal com s'ha descrit per altres tipus cel·lulars (Ahmed et al., 1997; Ozes et al., 1999; Wright et al., 1999). A més, la inhibició de la PI3K incrementa la sensibilitat *ex vivo* de les LLC-B als tractaments amb fludarabina, glucocorticoids, clorambucil, irradiació- γ i l'apoptosi mediada per FAS (Barragán et al., 2002; Wickremasinghe et al., 2001).

La PI3K provoca l'activació de diferents vies de transducció del senyal, com pot ser la via de p70^{S6K} (de *p70 S6-kinase*). El tractament amb rapamicina, un inhibidor específic de p70^{S6K}, no té cap efecte ni en la supervivència de les LLC-B ni en l'activitat antiapoptòtica del TPA i IL-4, descartant la implicació d'aquesta via en aquests efectes (Ringshausen et al., 2002; Barragán et al., 2002).

La proteïna serina/treonina quinasa Akt/PKB és un dels mediadors de la via PI3K (Datta et al., 1999; Brazil i Hemmings, 2001). Les cèl·lules de LLC-B fresques presenten activitat Akt constitutiva. La IL-4 induïx la fosforilació d'Akt depenent de PI3K i la supervivència de les cèl·lules (Barragán et al., 2002), el que suggereix un mecanisme d'inhibició d'apoptosi depenent de PI3K. La quinasa Akt és capaç de fosforilar i inactivar múltiples proteïnes implicades en el control de l'apoptosi, com Bad

(Datta et al., 1997; Zha et al., 1996; del Peso et al., 1997), caspasa-9 (Cardone et al., 1998) i factors de transcripció de la família Forkhead (Brunet et al., 1999), tot i que no està analitzat en el nostre model. Les cèl·lules d'alguns pacients no presenten formes d'Akt fosforilades constitutivament, tot i que segueixen sent sensibles a la inhibició de PI3K per LY294002 (Barragán et al., 2002).

4.3.3. Via de la MAPK.

Les MAPKs, proteïnes quinasa activades per mitogen, han estat implicades en la regulació de l'apoptosi per diferents estímuls en diferents models. La família de MAPK inclou les vies d'ERK1/2, p38-MAPK i JNK, les quals són fosforilades i activades per MAPKs específiques que estan per sobre d'elles (Franklin i McCubrey, 2000; O'Gorman i Cotter, 2001).

L'activació de la via PKC i el factor de supervivència SDF-1, però no la IL-4, indueixen la fosforilació d'ERK1/2, que és indetectable en les cèl·lules de LLC-B no estimulades. No obstant, la inhibició de la ERK1/2 ni afecta la viabilitat de les LLC-B ni bloqueja l'efecte antiapoptòtic del TPA (Barragán et al., 2002; Burger et al., 2000). Això indica que aquesta via no participa en l'efecte antiapoptòtic del TPA i la IL-4 en les LLC-B, tot i que no es pot excloure que participi en la supervivència induïda per altres factors.

La p38-MAPK està constitutivament activada en les LLC-B (Kawauchi et al., 2002) i se l'ha implicat en l'apoptosi induïda per Rituximab i la vitamina-D3 (Pedersen et al., 2002; Pepper, et al., 2003). La JNK no està constitutivament activada en les LLC-B (Kawauchi et al., 2002). Aquesta via ha estat poc analitzada pel fet que fins ara no hi havia bons inhibidors. La inhibició d'aquestes vies no afecta l'apoptosi induïda per acadesina (Campàs et al., 2003).

4.3.4. Via de JAK/STAT.

Les proteïnes STAT (de *signal transducer and activator of transcription*), que són fosforilades per la família de quinases Jak i altres tirosines quinases, juguen un paper clau en la resposta de les cèl·lules hematopoiètiques a la majoria de citocines (Ward et al. 2000; Darnell, 1997). Les citocines indueixen l'activació de les proteïnes STAT, que regulen l'expressió de gens involucrats en la supervivència cel·lular (Battle i Frank, 2002). Les cèl·lules de LLC-B tot i que presenten fosforilació constitutiva dels STAT1 i STAT3, no tenen activitat STAT constitutiva (Frank et al., 1997).

4.3.5. La via de NF- κ B.

La quinasa I κ B (IKK) activa el factor de transcripció NF- κ B (de *Nuclear factor-kappa B*) per fosforilació del seu inhibidor I κ B α (Karin i Lin, 2002). Les cèl·lules de LLC-B tenen nivells alts d'activitat NF- κ B, en canvi l'activitat de IKK no està augmentada en els limfòcits de LLC-B si es comparen amb els limfòcits CD19+ normals (Munzert et al., 2002). La lligació de CD40 i la seva combinació a activació de BCR augmenta l'activitat NF- κ B i prolonga la supervivència *ex vivo* de les LLC-B (Furman et al., 2000, Bernal et al., 2001). NF- κ B regula l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques, com Bcl-X_L, FLIP i diferents membres de la família de les IAPs (Karin i Lin, 2002). L'activació de NF- κ B podria explicar l'efecte de la lligació de CD40 en l'expressió de Bcl-X_L i FLIP a les cèl·lules de LLC-B (Kitada et al. 1999).

4.3.6. La via de p53/ATM.

La proteïna p53, que és la proteïna més freqüentment alterada en càncers humans, té com a funció evitar el creixement descontrolat de la cèl·lula en resposta a diferents agressions, com dany al DNA, deprivació de metabòlits, dany físic a la cèl·lula i estrès. Quan s'indueix p53, aquesta pot inhibir la proliferació cel·lular segrestant la cèl·lula en la fase G1 del cicle, mediada per la inducció de l'inhibidor de quinases dependents de ciclina, p21^{waf1/cip1}, o bé induir l'apoptosi per eliminar la cèl·lula malmesa. Aquesta via està alterada en un percentatge important dels casos de LLC-B, aproximadament un 15%, amb diferències entre pacients no tractats (7%) i pacients pretractats o refractaris al tractament (50%). Les alteracions de p53 estan associades a estadis avançats de la malaltia, excés de prolifèrants, major incidència de transformació a síndrome de Richter i baixa resposta al tractament amb anàlegs de purina i agents alquilants (Oscier et al., 2002; Thornton et al., 2004).

L'estabilitat i l'activitat transactivadora de p53 estan regulades per una complexa xarxa de transducció de senyals on juguen un paper important diferents quinases com ATM, ATR o DNA-PK. D'entre els mecanismes de regulació hi destaca la fosforilació per la quinasa ATM (Vousden i Lu, 2002). El gen ATM codifica per una serina/treonina quinasa que participa en múltiples rutes bioquímiques que lliguen el dany al DNA amb les múltiples respostes cel·lulars, com la regulació del cicle cel·lular, mecanismes de reparació o l'apoptosi (Durocher i Jackson, 2001). S'han trobat mutacions i deleccions del gen ATM en pacients de LLC-B i aquestes alteracions estan associades a una disfunció de p53 (Stankovic et al., 1999; Bullrich et al., 1999; Schaffner et al., 1999;

Pettitt et al, 2001). A més, ATM ha estat l'única proteïna quinasa que s'ha trobat mutada en la LLC-B. Altres mecanismes implicats en el control de p53 són la ubiquïtinització i degradació catalitzada per Mdm-2 i Pirh2. En condicions normals, els nivells de p53 a la cèl·lula són baixos ja que s'uneix a la proteïna Mdm-2, que indueix la seva degradació pel proteosoma. El dany al DNA i altres senyals d'estrès indueixen la fosforilació tant de p53 com de Mdm-2, impedit la seva unió, pel que s'estabilitza i activa p53. La proteïna Mdm-2, s'expressa en alts nivells en molts casos de LLC-B, però no s'ha analitzat la seva regulació en aquestes cèl·lules.

Els mecanismes pels quals p53 promou l'apoptosi impliquen l'activació de gens específics, per mecanismes dependents i independents de transcripció. Així, p53 pot induir apoptosi per activació transcripcional de gens proapoptòtics com *nox*, *puma*, *bax*, *p53AIP* i *apaf-1*, i per repressió transcripcional de *bcl-2* i algunes IAPs (Johnstone et al., 2002). Recentment s'ha descrit que Puma és necessari per l'apoptosi induïda per p53 (Jeffers et al., 2003). S'ha demostrat que en resposta a danys al DNA, p53 transloca al mitocondri on s'uneix a Bcl-X_L i Bcl-2 provocant la permeabilització de la membrana mitocondrial i la sortida del citocrom-c (Mihara et al., 2003). A més, p53 pot actuar al citosol induint apoptosi per activació de Bax de forma independent de transcripció (Marchenko et al., 2000; Chipuk et al., 2004). Per unió directa a Bak, p53 bloqueja la interacció d'aquesta proteïna proapoptòtica amb Mcl-1, i Bak s'activa (Leu et al., 2004). La quinasa ATR no s'expressa en les cèl·lules de LLC-B ni en els limfòcits quiescents en general, pel que el dany al DNA induït per radiació ultravioleta no causa l'activació de p53 i no es repara de forma completa en les cèl·lules de LLC-B (Jones et al., 2004) (Figura-I14).

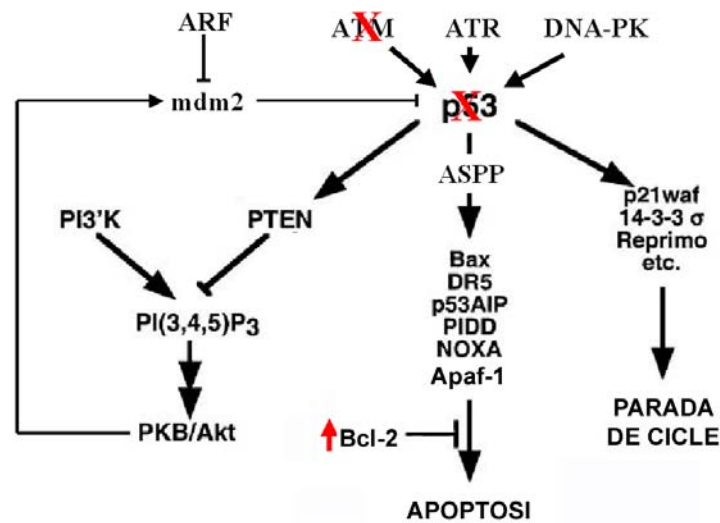


Figura-I14. Esquema de les principals vies relacionades amb p53. A l'esquema es mostren les principals vies i quinases connectades amb p53 en l'apoptosi i la parada de cicle. En vermell s'indiquen les proteïnes amb alteracions descrites en LLC-B: ATM, p53 i Bcl-2 (de la Tesi Doctoral de Clara Campàs, 2004).

4.3.7. Quinases regulades per nucleòtids.

L'activació de la PKA (de *cAMP-dependent protein kinase*) en cèl·lules hematopoètiques té tant efectes proapoptòtics com antiapoptòtics (Franklin i McCubrey, 2000). Alguns agents que augmenten els nivells d'AMPc, com ara els inhibidors de la PDE (de *phosphodiesterase*), indueixen apoptosi en les LLC-B (Lerner et al, 2000), que han de ser en part independents de l'acumulació d'AMPc ja que no hi ha correlació entre els nivells d'AMPc i la inducció d'apoptosi en aquestes cèl·lules (Mentz et al., 1999; Sarfati et al., 2003). Els inhibidors de la PDE també provoquen l'acumulació de GMPc, que activa la PKG (de *cGMP-dependent protein kinase*). Alguns anàlegs del sulindac s'ha vist que indueixen apoptosi en cèl·lules primàries de LLC-B i en la línia WSU-CLL, derivada de LLC-B (Moon et al.,2002).

Al nostre grup, s'està estudiant l'efecte apoptòtic de l'acadesina (Aicar), un intermediari de la biosíntesis de nucleòtids de purina. En les cèl·lules de LLC-B, l'acadesina indueix apoptosi a les cèl·lules B, però no indueix apoptosi a les cel·lules T. Tot i que encara no coneixem el mecanisme exacte d'inducció d'apoptosi per acadesina, alguna quinasa regulada per ZMP hi podria estar implicada (Campàs et al., 2003).

4.3.8. Quinases dependents de ciclins (Cdks).

Les Cdks (de *Cyclin-dependent kinases*) són proteïnes quinases implicades en la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi. Tot i que les cèl·lules de LLC-B són quiescents, les Cdks podrien intervenir en la regulació de l'apoptosi en aquestes cèl·lules. El Flavopiridol és una flavona sintètica, que inhibeix algunes Cdks i indueix apoptosi a les cèl·lules de LLC-B de manera independent de p53 (Parker et al, 1998; Byrd et al., 1998) i disminueix els nivells d'algunes proteïnes antiapoptòtiques com, Mcl-1, XIAP, BAG-1 i Bcl-2 (Kitada et al., 2000; Pepper et al., 2001). El Flavopiridol ha estat el primer modulador de Cdks testat en assajos clínics, i s'està investigant pel tractament de la LLC-B (Senderowicz et al., 2001).

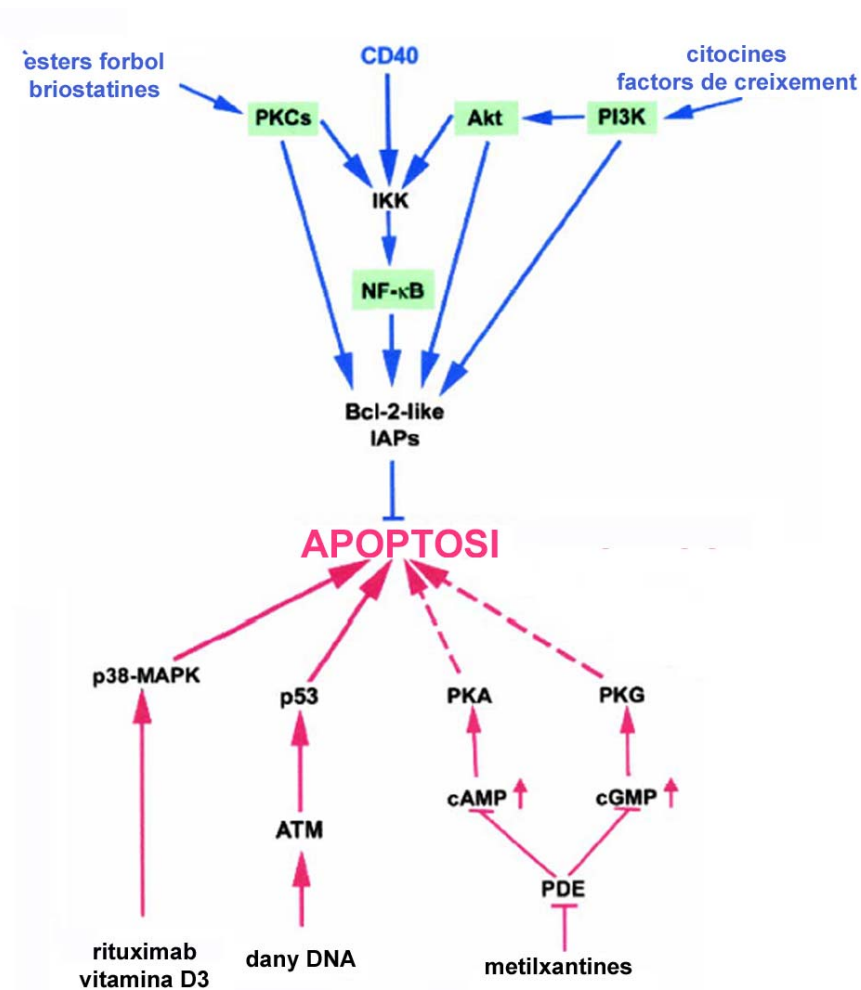


FIGURA-115. Xarxa de transducció de senyals en la LLC-B. Es resumeixen les diferents vies de transducció de senyals i les principals proteïnes quinases implicades en el control de l'apoptosi i la supervivència de les cèl·lules de LLC-B. En color verd es mostren les proteïnes activades constitutivament (PI3K, PKC i NFκB), en color blau es mostren les vies que induïxen l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques, i en vermell les vies inductores d'apoptosi. Les línies discontinues indiquen les vies que estan poc demostrades (adaptat de Barragán et al., 2003).

Les vies de la PKC i de la PI3K són molt importants per la supervivència de les cèl·lules de LLC-B (Barragán et al., 2002). Les vies de supervivència afecten a proteïnes involucrades en el control de l'apoptosi, alterant la seva expressió o la seva funció. Per exemple, les activitats PKC i PI3K poden controlar l'expressió de factors de transcripció com NF κ B (Ozes et al, 1999), i l'activació d'aquests pot induir l'expressió de gens antiapoptòtics en les cèl·lules de LLC-B (Kitada et al., 1999; Furman et al., 2000). Dels estudis que el nostre grup ha dut a terme per esbrinar quines són les vies implicades en la supervivència i l'apoptosi de les cèl·lules de LLC-B, i basant-nos també en les dades bibliogràfiques, es planteja una hipòtesi de com deuen ser aquestes. En aquesta hipòtesi, l'activitat constitutiva de les vies PI3K i PKC en les cèl·lules de LLC-B, mantenen l'expressió i activació de proteïnes antiapoptòtiques com Mcl-1 i XIAP, que afavoririen la supervivència. L'activació d'aquestes vies per factors de supervivència pot incrementar l'expressió d'aquestes proteïnes antiapoptòtiques, protegint així a les cèl·lules de l'apoptosi espontània i de la induïda per diferents agents quimioterapèutics. D'altra banda, la inhibició de les vies PKC i PI3K incrementa l'apoptosi induïda per agents quimioterapèutics, el que fa pensar que es podrien donar les drogues quimioterapèutiques combinades amb els inhibidors de PKC o PI3K, per fer més eficaç la teràpia. Aquests estudis obren noves esperances pel disseny de fàrmacs que tinguin com a dianes algun punt de les vies que indueixen supervivència a les cèl·lules de LLC-B (Tesi Docotral Montserrat Barragán)(Figura-I15).