

---

**OBJECTIUS**



## **OBJECTIUS**

L'objectiu d'aquesta Tesi ha estat l'anàlisi de la regulació de diferents gens implicats en el control del procés apoptòtic en cèl·lules d'origen limfàtic. L'estudi s'ha centrat bàsicament en dos gens de la família de Bcl-2, un d'antiapoptòtic, *mcl-1*, i un de proapoptòtic, *bim*. S'ha estudiat la regulació d'aquests gens a nivell transcripcional i traducciona, així com les principals vies de transducció del senyal implicades en cada cas. Els estímuls utilitzats en cada cas són diferents, podent ser tant estímuls inductors d'apoptosi com de supervivència, escollits en funció del que es coneixia de la bibliografia i de les diferents línies de recerca obertes al nostre grup. S'han utilitzat dos models cel·lulars; cultius primaris de cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica de tipus B (LLC-B) i, per fer els estudis de mecanisme, la línia prolinfocítica derivada de cèl·lules T Jurkat, degut als inconvenients que presenten els cultius primaris de LLC-B per fer aquests tipus d'estudi.

Els objectius concrets plantejats per aquesta Tesi es poden desglossar en els següents punts:

### **Estudi de la regulació d'Mcl-1.**

- Regulació transcripcional i traducciona d'Mcl-1 en l'apoptosi induïda per aspirina (ASA) i estaurosporina (Ssp) a la línia cel·lular Jurkat.
- Anàlisi d'insercions al promotor d'Mcl-1 en cèl·lules de LLC-B.

### **Estudi de la regulació de BIM.**

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

### **Estudi del promotor del gen *xiap*.**



---

## ***RESULTATS i DISCUSSIÓ***



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





## **REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL I TRADUCCIONAL D'MCL-1 EN L'APOPTOSI INDUÏDA PER ASPIRINA I ESTAUROSPORINA A LA LÍNIA CEL·LULAR JURKAT.**

### **1. INTRODUCCIÓ.**

La proteïna Mcl-1 és un regulador clau del procés d'apoptosi en diferents models cel·lulars, interferint en els estadis primerencs d'aquest procés, promovent la supervivència de la cèl·lula. La proteïna Mcl-1, que té un vida mitja molt curta, s'indueix ràpidament en resposta a senyals de supervivència i diferenciació, i té un ràpida degradació enfront als estímuls apoptòtics, pel què sembla ser una proteïna clau en la resposta de les cèl·lules a canvis ambientals ràpids. En la seva regulació, s'han descrit tant efectes a nivell de regulació de l'activitat transcripcional del promotor, com disminucions en la seva síntesi traduccional (Akgul et al., 2000; Cuconati et al., 2003; Nijhawan et al., 2003).

#### **1.1. Limitacions dels cultius primaris de LLC-B.**

Al nostre grup fa temps que s'estan estudiant les vies de supervivència i les vies d'apoptosi en cèl·lules de pacients amb leucèmia limfàtica crònica de tipus B (LLC-B), com a principal línia de recerca. Membres del grup també han descrit la inducció d'apoptosi per aspirina i salicilats a les cèl·lules de LLC-B, on es demostra que la inhibició de la COX, que és diana directa dels AINEs (drogues antiinflamatories no esteroïdals, de l'anglès NSAIDs), no és suficient per induir l'apoptosi (Bellosillo et al., 1998). Les cèl·lules de LLC-B són cultius primaris que provenen directament de pacients, i per tant, són mostres molt valuoses, quantitativament limitades i a més, presenten una elevada heterogeneïtat. Es podria dir que "cada pacient és un món". Els cultius primaris de LLC-B presenten limitacions importants per la realització d'estudis funcionals i mecanístics, ja que encara no s'han pogut transfectar, el que impossibilita que es puguin realitzar experiments de sobreexpressió de proteïnes o d'anàlisi de promotors amb gens *reporter*. Aquestes característiques i limitacions són inconvenients alhora d'analitzar el mecanisme d'acció de les drogues, per la caracterització del mecanisme molecular que hi ha al darrere de qualsevol fenomen biològic, i en general, per fer qualsevol estudi molecular de recerca bàsica. Per totes aquestes raons, es va decidir estudiar la regulació d'Mcl-1 al model de la línia cel·lular humana Jurkat, derivada d'una leucèmia aguda de limfòcits T. Aquesta, és una de les

línies cel·lulars més utilitzades en estudis d'apoptosi, pel que està molt ben caracteritzada, i en la que el grup té una àmplia experiència en la seva manipulació.

### **1.2. Experiències amb les cèl·lules Jurkat.**

Al nostre grup, la Dra. Maria Piqué, va caracteritzar el mecanisme d'inducció d'apoptosi per aspirina i salicilats al model de cèl·lules Jurkat (Piqué et al., 2000; Tesi Doctoral de Maria Piqué, 2000). Així doncs, ja sabem que l'aspirina, pels estudis previs del grup, i l'estaurosporina, pel que estava descrit a la bibliografia, induïen apoptosi a les cèl·lules Jurkat, i que en la inducció d'aquesta es disminuïen els nivells de la proteïna Mcl-1. A més a més, la Dra. Piqué va analitzar la sortida del citocrom-c del mitocondri pel tractament amb aspirina (Piqué et al., 2000).

### **1.3. Les drogues: aspirina i estaurosporina.**

Abans de començar a explicar els resultats dels experiments d'aquest estudi, primer de tot cal presentar les dues drogues inductores d'apoptosi.

L'aspirina és un derivat acetilat del salicilat, i pertany al grup de drogues antiinflamatòries no esteroidals (AINEs). S'ha descrit el seu efecte preventiu contra el risc de patir càncer: en observacions clíniques, com la reducció de la grandària i el número de pòlips en pacients amb poliposi adenomatosa familiar (FAP) tractats amb AINEs (Waddel i Loughry, 1983); en estudis epidemiològics, on es correlaciona el consum d'aspirina amb una reducció de la incidència de càncer colorectal (Kune et al., 1988; Thun et al., 1991); o en estudis en models animals, on es descriu que diferents AINEs, entre ells l'aspirina, inhibeixen el creixement de tumors induïts per carcinogènesi química (Craven i DeRubertis, 1992; Reddy et al., 1993). S'ha proposat que l'acció antitumoral dels AINEs podria ser deguda a la inhibició de la proliferació cel·lular, inhibició en la producció de carcinògens, la potenciació del sistema immune, inhibició de l'angiogènesi o la inducció d'apoptosi (Shiff i Rigas, 1997). A nosaltres ens interessa l'aspirina per la seva capacitat inductora d'apoptosi.

L'estaurosporina és un potent inhibidor de diferents proteïnes quinases. A la bibliografia està àmpliament descrita la seva capacitat d'inhibir la transcripció de diferents gens (Rigaut et al., 1993; Erdos i Lee, 1994; Desai et al., 1995).

## **2. RESULTATS.**

### **2.1. Antecedents de l'estudi.**

En estudis previs del grup, realitzats per la Dra. Maria Piqué, s'havien analitzat els nivells de diferents membres de la família de Bcl-2 durant l'apoptosi induïda pel tractament amb aspirina. L'anàlisi de la modulació d'aquests membres, va revelar que durant el tractament de les cèl·lules Jurkat amb aspirina 10 mM, els nivells de Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> es mantien constants al llarg de la incubació, a diferència del que passava amb els nivells d'Mcl-1, que disminuïen durant el tractament, essent aquesta disminució detectable a les 3-4 hores, i molt marcada a partir de les 6 hores.

### **2.2. Canvis als nivells de la proteïna Mcl-1 en l'apoptosi induïda pels tractaments amb aspirina i estaurosporina.**

El primer que es va fer, en col·laboració amb la Dra. Maria Piqué i el Dr. José Manuel López, va ser analitzar per Western blot com estava afectada l'expressió de les proteïnes Mcl-1 i Bcl-2 a les cèl·lules Jurkat tractades amb aspirina (ASA) i estaurosporina (Ssp). Les dosis utilitzades per cada droga van ser 10 mM per l'aspirina i 1 µM per l'estaurosporina. Els temps de tractament amb les dues drogues va ser diferent, ja que cada una trigava un temps específic a fer entrar les cèl·lules en apoptosi, ja que els seus mecanismes d'acció són diferents. A les dosis utilitzades, el tractament d'1 µM d'estaurosporina era molt més potent com inductora de l'apoptosi en temps i reduint la viabilitat, respecte el tractament amb 10 mM d'aspirina.

#### **2.2.1. Experiments de Western blot.**

Es va veure que els nivells de la proteïna Mcl-1 es reduïen significativament a 0,5 i 3 hores de tractament amb estaurosporina (Figura-1A) i aspirina (Figura-1B) respectivament. En canvi, no es van detectar canvis a la proteïna Bcl-2, que té una vida mitja molt més llarga, que ens va servir com a control de càrrega de l'experiment. Durant els diferents temps d'assaig amb les dues drogues, es va determinar la viabilitat cel·lular, observant-se un progressiu descens, que va ser més evident amb el tractament amb estaurosporina. Cal remarcar que la caiguda de la proteïna Mcl-1 era paral·lela al descens de la viabilitat cel·lular.

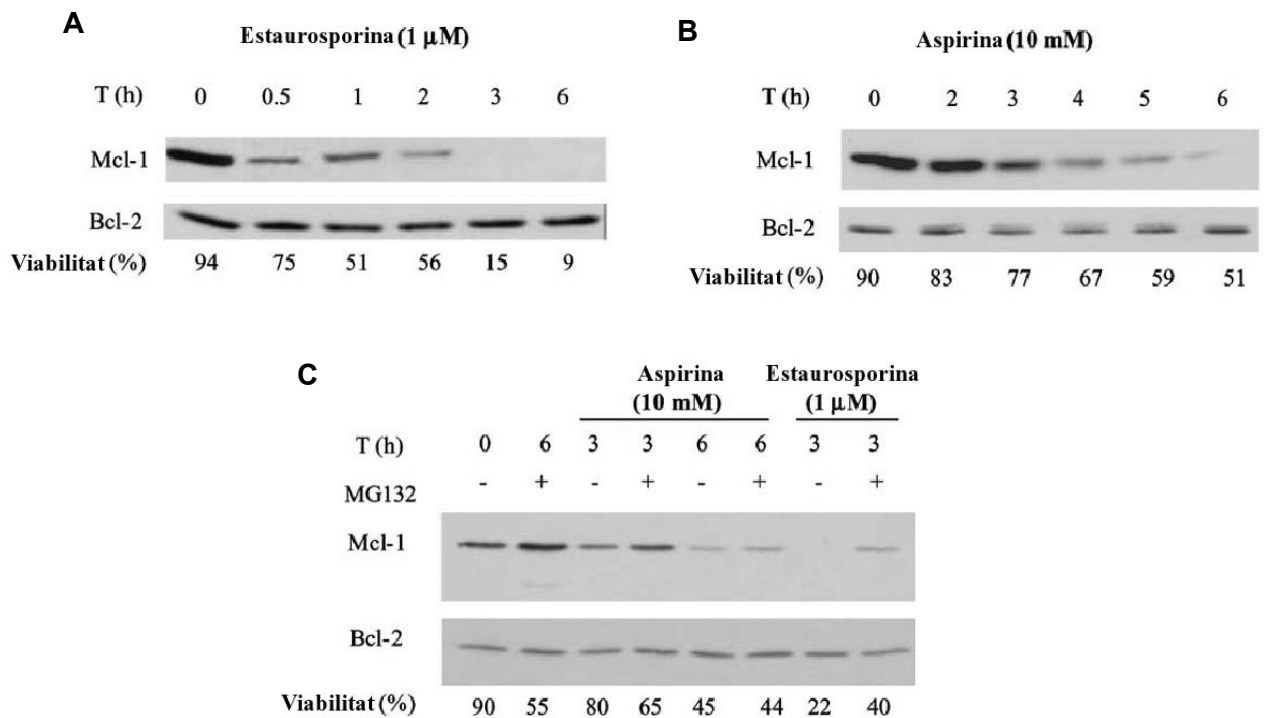


FIGURA-1. Anàlisi dels nivells de proteïna Mcl-1 durant l'apoptosi. Les cèl·lules Jurkat ( $0.5 \times 10^6$  cèl·lules/ml) van ser tractades amb estaurosporina (1  $\mu$ M) (A) o aspirina (10 mM) (B) durant diferents temps. Les cèl·lules van ser recollides al mateix moment i processades per analitzar els nivells de les proteïnes d'estudi per Western blot tal i com s'especifica als materials i mètodes. Es van carregar 50  $\mu$ g de proteïna per analitzar els nivells d'Mcl-1 i de Bcl-2. (C) Estudi de l'efecte de l'inhibidor del proteasoma MG132 en la caiguda d'Mcl-1 durant l'apoptosi. Les cèl·lules Jurkat van ser incubades amb estaurosporina (1  $\mu$ M) o aspirina (10 mM) soles o combinades amb MG132 (2,5  $\mu$ g/ml) durant diferents temps d'estudi, i vam analitzar els nivells de les proteïnes anteriors. La viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux s'ensenya per cada temps a la part inferior de cada figura.

A la bibliografia estava descrit en diferents models, que els nivells de la proteïna Mcl-1 eren regulats per la via de degradació del proteasoma. Vàrem voler determinar al nostre model, si en aquesta disminució dels nivells d'Mcl-1 hi estava implicada la via de degradació del proteasoma. Es va analitzar l'efecte de l'inhibidor del proteasoma, MG132, preincubat 1 hora abans dels tractaments amb estaurosporina i aspirina. Com es veu a la Figura-1C, l'inhibidor MG132 va bloquejar parcialment la caiguda de la proteïna Mcl-1. De totes maneres, cal tenir en compte que l'inhibidor per si sol ja va provocar un significatiu descens de la viabilitat cel·lular, que no es va veure incrementat amb el tractament de les drogues. Aquests resultats indiquen que la proteïna Mcl-1 es degrada, almenys en part, per la via del proteasoma.

### **2.2.2. Implicació de les caspases en la disminució dels nivells d'Mcl-1.**

La inducció del procés apoptòtic comporta l'activació de la cascada de caspases, que conduiran a les cèl·lules a la mort, degradant-se un ampli ventall de proteïnes que són substrats d'aquestes proteases. Vam voler determinar la contribució de les caspases en el mecanisme de disminució d'Mcl-1 durant l'apoptosi induïda per les dues drogues d'estudi. Es van analitzar els nivells de diferents proteïnes per Western blot en cèl·lules tractades amb estaurosporina o aspirina (a les mateixes dosis descrites, que van ser les mateixes al llarg de tot l'estudi), en presència o absència de l'inhibidor de caspases d'ampli espectre Z-VAD.fmk (200  $\mu$ M) preincubat 1 hora. Com a control de que l'inhibidor estava bloquejant l'activació de les caspases, es va analitzar l'activació de la caspasa-3, mitjançant la desaparició de la seva forma zimògena. A les cèl·lules tractades amb aspirina, com que l'activació de la caspasa-3 no era molt evident a temps curts, també es va analitzar l'activació de la caspasa-9, per aparició d'un producte intermedi del seu processament de 37 kDa. Com es pot veure a la Figura-2A pel tractament amb estaurosporina, i a la Figura-2B pel tractament amb aspirina, el descens dels nivells d'Mcl-1 durant l'apoptosi només va ser parcialment protegit per Z-VAD.fmk. Novament, els nivells de Bcl-2 no van variar. En els Western blots es pot veure l'eficàcia del Z-VAD.fmk, ja que clarament es va bloquejar la desaparició de la forma precursora de la caspasa-3, i també l'aparició de la forma intermèdia de la caspasa-9, que apareix a les 3 hores i va ser totalment bloquejada. El Z-VAD.fmk també va evitar la caiguda de la viabilitat cel·lular mesurada per l'exposició de fosfatidilserina. Els resultats demostren que el tractament amb Z-VAD.fmk només protegeix parcialment la caiguda d'Mcl-1 induïda per les dues drogues d'estudi. Per tant, la caiguda d'Mcl-1 no és deguda únicament a l'activació de les caspases, pel què hi estan implicades tant vies dependents com independents de l'activació de les caspases en aquesta caiguda.

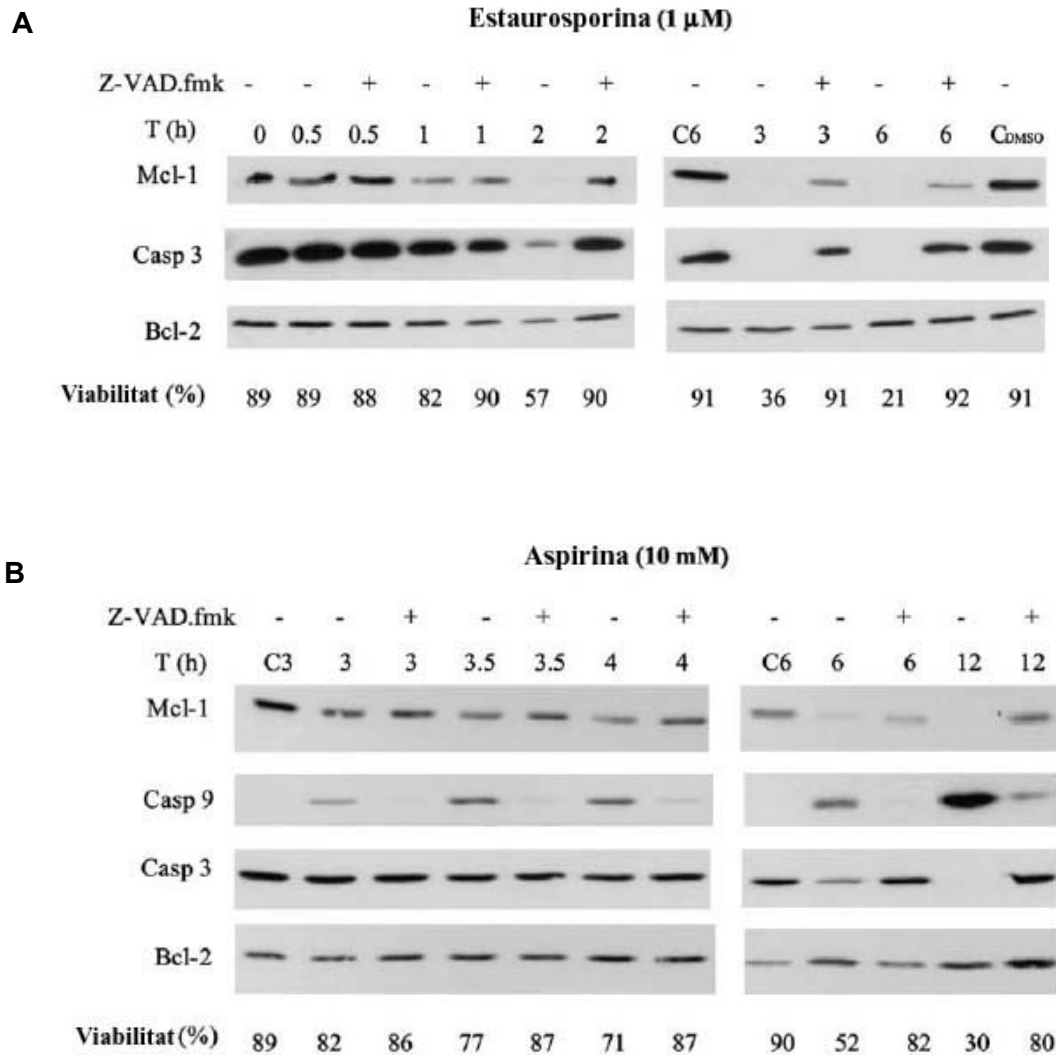


FIGURA-2. Efecte del Z-VAD.fmk en la caiguda d'Mcl-1 durant l'apoptosi. Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb estaurosporina (1  $\mu$ M) (A) o amb aspirina (10 mM) (B), soles o combinades amb l'inhibidor de caspases Z-VAD.fmk (200  $\mu$ M) durant diferents temps. Les cèl·lules van ser recollides al mateix temps per l'anàlisi dels nivells proteics per Western blot. Es van carregar 50  $\mu$ g de proteïna i es van analitzar els nivells d'Mcl-1, Bcl-2, caspasa-3 i caspasa-9 (pel tractament amb aspirina). Com a controls addicionals es van utilitzar mostres de cèl·lules incubades 3 o 6 hores sense les drogues (C3, C6) o amb DMSO, que és el solvent de l'estaurosporina (C<sub>DMSO</sub>). Al peu de cada una de les figures es mostra la viabilitat cel·lular.

### **2.3. Canvis en l'expressió dels nivells de missatger d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda per estaurosporina.**

#### **2.3.1. Experiments de Northern blot.**

La reducció dels nivells de la proteïna Mcl-1 durant l'apoptosi pot ser explicada tant per mecanismes d'inhibició transcripcional com per mecanismes d'inhibició traduccional, ja que tant la proteïna com el missatger d'Mcl-1 tenen vides mitges molt curtes (Yang et al., 1995; 1996). Es van mesurar els nivells d'RNAm d'*mcl-1* per Northern blot. A la bibliografia estaven descrites una banda major de 3,8 kb (*kilobases*) i una menor de 2,5 kb corresponents als missatgers d'*mcl-1* en mostres humanes (Kozopas et al., 1993). A les cèl·lules Jurkat era difícil de veure el transcrit de 2,5 kb, i la seva regulació seguia el mateix patró que el transcrit de 3,8 kb, pel que només vam estudiar aquest darrer. Com es pot veure a la Figura-3A, el tractament amb estaurosporina reduïa els nivells de missatger de manera paral·lela a la reducció dels nivells de proteïna, suggerint que la droga estava inhibint la transcripció d'*mcl-1* a les cèl·lules Jurkat. De totes maneres, aquests resultats no descartaven la possibilitat que durant l'apoptosi induïda per estaurosporina, els nivells de missatger d'*mcl-1* poguessin estar afectats per processament o canvis en l'estabilitat.

#### **2.3.2. Implicació de les caspases en la modulació del missatger d'*mcl-1*.**

Vam voler determinar si en aquesta disminució dels nivells de missatger d'*mcl-1* per estaurosporina hi estaven implicades d'alguna manera les caspases. La preincubació de les cèl·lules amb Z-VAD.fmk abans del tractament amb la droga va inhibir completament la caiguda dels nivells de missatger (Figura-3B). En canvi, com s'ha demostrat anteriorment, l'inhibidor de caspases només protegia parcialment la caiguda de la proteïna, indicant l'existència de mecanismes post-transcripcionals caspasa-independents involucrats en la disminució d'Mcl-1 durant el tractament amb estaurosporina. Com a controls de la inducció d'apoptosi per estaurosporina i de l'eficàcia del Z-VAD.fmk, es va analitzar la desaparició de la forma precursora de la caspasa-3 i el processament de la proteïna PARP, que és substrat de caspases. Els resultats obtinguts indiquen que durant el tractament de les cèl·lules Jurkat amb estaurosporina, es produeix una disminució dels nivells de missatger d'*mcl-1*, i que aquesta caiguda és completament dependent de l'activació de les caspases.

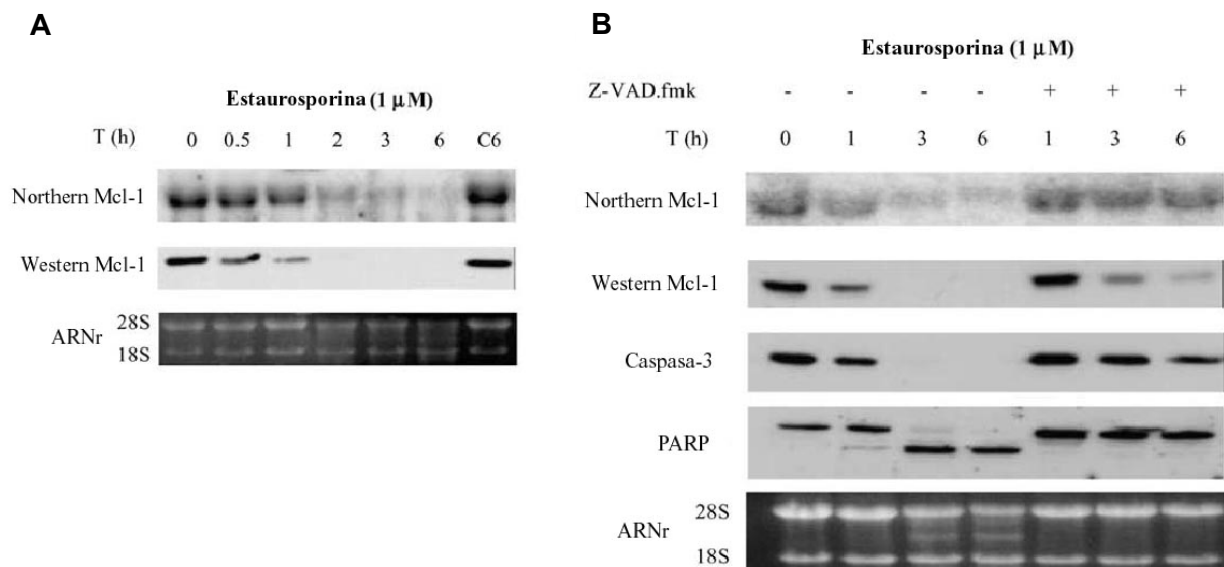


FIGURA-3. Anàlisi de l'expressió dels nivells de missatger d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda per estaurosporina. (A) Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb estaurosporina (1 μM) durant diferents temps i van ser recollides al mateix moment (10 X 10<sup>5</sup> cèl·lules per condició). Es va aïllar l'RNA total tal i com es descriu als materials i mètodes, i es van carregar 10 μg d'RNA per condició per l'assaig de Northern blot, utilitzant una sonda marcada radioactivament amb fòsfor, (*mcl-1*-<sup>32</sup>P-cDNA). Com a control de càrrega s'ensenya la tinció amb bromur d'etidi del gel on es veuen els RNAs ribosomals 18S i 28S. També es van determinar per Western blot els nivells proteics d'Mcl-1. Aquest és un experiment representatiu de tres. El carril C6 són cèl·lules Jurkat incubades durant 6h sense estaurosporina. (B) Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb estaurosporina (1 μM) en presència o absència de Z-VAD.fmk (200 μM) durant diferents temps; les cèl·lules es van recollir al mateix temps, i es van determinar els nivells de missatger d'*mcl-1* per Northern blot, i es van carregar 50 μg de proteïna per assajar els nivells de les proteïnes Mcl-1, caspasa-3 i PARP per Western blot.

### 2.3.3. Estudis amb el promotor d'*mcl-1*.

Per tal d'aprofundir més en la regulació transcripcional d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda per estaurosporina, es van transfectar les cèl·lules Jurkat amb el promotor murí d'*mcl-1* (-2400 a +10) fusionat davant del gen *reporter* de la luciferasa. Vam analitzar la caiguda de l'activitat luciferasa a diferents temps d'experimentació, comparant el tractament amb estaurosporina amb el tractament amb actinomicina-D, un inhibidor general de la transcripció. Com es veu a la Figura-4A, l'activitat luciferasa va disminuir amb els dos tractaments, però va ser més marcada amb el tractament amb estaurosporina. La combinació d'estaurosporina més actinomicina-D tenia els mateixos efectes que el tractament amb estaurosporina sola. La concentració d'actinomicina-D utilitzada per fer aquests experiments va ser de 5 μg/ml, que sabem que inhibia la transcripció a les cèl·lules Jurkat (Bott et al., 1994) sense afectar la viabilitat cel·lular a temps curts d'incubació (Kasai et al., 1998). D'acord amb el que



estava descrit a la bibliografia, el tractament amb actinomicina-D no va reduir significativament la viabilitat cel·lular durant les tres primeres hores, mentre que l'estaurosporina sí que ho va fer (Figura-4B). Encara que no s'ensenya, la viabilitat cel·lular va disminuir pel tractament amb actinomicina-D a temps llargs. Aquests resultats, i els prèviament exposats, suggereixen que l'estaurosporina inhibeix la transcripció de la construcció que conté el promotor d'*mcl-1*, induint la disminució de l'activitat luciferasa. A més, han d'haver-hi mecanismes de regulació post-transcripcionals, ja que els efectes del tractament amb estaurosporina són més marcats que els efectes amb actinomicina-D.

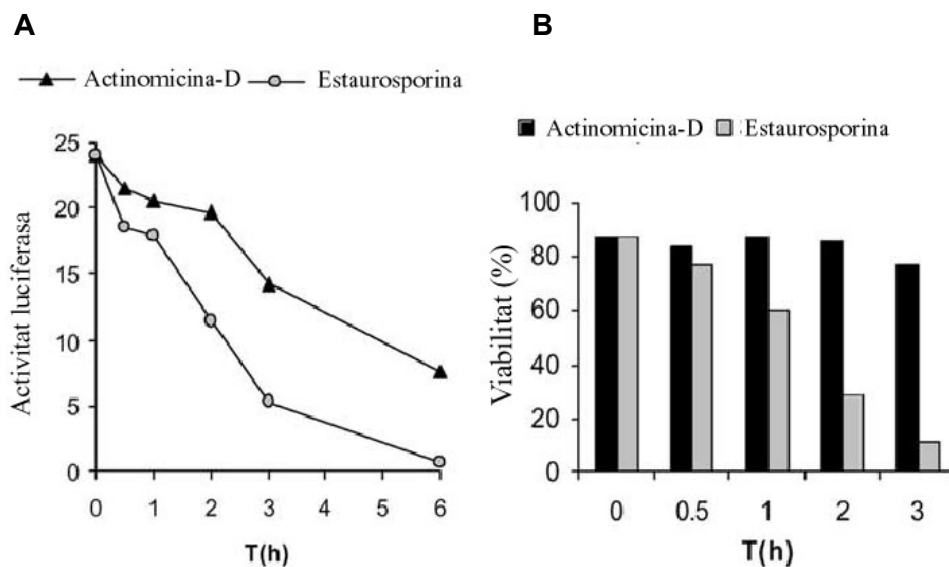


FIGURA-4. Anàlisi de l'activitat transcripcional d'*mcl-1* durant els tractaments amb estaurosporina i actinomicina-D. (A) Les cèl·lules Jurkat van ser electroporades amb 10  $\mu\text{g}$  de la construcció que conté el promotor murí d'*mcl-1*; 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules van ser tractades amb estaurosporina (1  $\mu\text{M}$ ) o actinomicina-D (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durant diferents temps d'assaig. (B) Es mostra la viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux tal i com es descriu als materials i mètodes. Les dades són la mitjana dels valors de dos experiments fets de manera independent.

## 2.4. Canvis en l'expressió dels nivells de missatger d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda per aspirina.

### 2.4.1. Experiments de Northern blot.

Ens vam preguntar si el tractament amb aspirina tindria els mateixos efectes sobre els nivells de missatger d'*mcl-1* que el tractament amb estaurosporina, per saber si també és produïa una inhibició de l'expressió a nivell transcripcional. Els resultats de l'anàlisi dels nivells de missatger d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda amb aspirina, van demostrar clarament que el tractament de les cèl·lules amb aquesta droga, almenys fins les 8 hores, no tenia cap efecte sobre els nivells de missatger d'*mcl-1*, mentre que la proteïna disminuïa ràpidament, tal i com es pot veure a la Figura-5. Aquests resultats suggereixen que durant el tractament amb aspirina tindria lloc una inhibició de la traducció dels missatgers d'*mcl-1*, ja que disminueixen els nivells proteics sense afectar-se els nivells de missatger. Els diferents mecanismes de regulació de l'estabilitat de la proteïna Mcl-1 també hi podrien estar jugant un paper important.

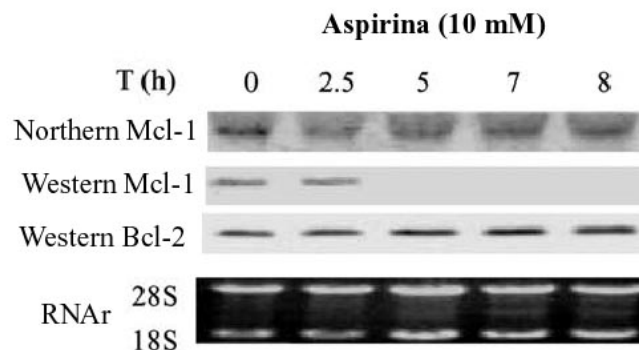


FIGURA-5. Anàlisi de l'expressió dels nivells de missatger d'*mcl-1* durant l'apoptosi induïda per aspirina. Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb aspirina (10 mM) durant diferents temps, i van ser recollides al mateix temps. 15 µg d'RNA total van ser analitzats per Northern blot per determinar els nivells de missatger d'*mcl-1*. Com a control de càrrega s'ensenyen els RNAs ribosomals tenyits amb bromur d'etidi. De cada condició, 50 µg de proteïna van ser analitzats per Western blot per determinar els nivells d'Mcl-1 i de Bcl-2. S'ensenyen un experiment representatiu de tres.

## **2.5. Determinació de la inhibició de la síntesi proteica durant el tractament amb aspirina.**

### **2.5.1. Estudis d'incorporació de leucina-tritiada.**

La inhibició de la síntesi proteica pot ser un mecanisme important de control del procés de mot cel·lular programada. Per veure si el tractament amb aspirina inhibia la síntesi proteica *de novo*, vàrem determinar com estava afectada aquesta, amb experiments d'incorporació de leucina-tritiada ( $[^3\text{H}]$ leucine) en la fracció precipitada de TCA, a les cèl·lules Jurkat tractades amb aspirina. Com es pot veure a la Figura-6A, a una hora de tractament amb aspirina hi havia una clara disminució de la taxa de síntesi proteica, quan encara no estava afectada la viabilitat ni s'havien activat les caspases. En experiments previs del nostre grup, s'havia determinat que en les cèl·lules Jurkat la sortida del citocrom-c i la posterior activació de les caspases no es donava fins a les 2-3 h després del tractament amb aspirina (Piqué et al., 2000). A la gràfica es pot veure clarament, que durant tots els temps de tractament amb aspirina tenia lloc aquesta inhibició de la síntesi proteica, tot i que hi havia incorporació de leucina-tritiada a les cèl·lules tractades amb aspirina, molt inferior en qualsevol cas, al de les cèl·lules control sense tractar. A les 5 hores de tractament amb aspirina, es tornava a donar un altre pic d'inhibició de la taxa de síntesi proteica.

### **2.5.2. Anàlisi de la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$ .**

Per tal de poder explicar els efectes del tractament amb aspirina sobre la síntesi de proteïnes, vam intentar determinar si algun dels components de la maquinària traduccional de la cèl·lula estava afectat pel tractament. Un dels factors necessaris pel reclutament dels ribosomes i per la traducció de proteïnes és el complex proteic eIF2 (Dever, 2002). La fosforilació d'una petita quantitat d'una de les subunitats del complex eIF2, la subunitat eIF2 $\alpha$ , pot bloquejar la iniciació de la síntesi proteica (Safer, 1983). Vam analitzar per Western blot els nivells de la forma fosforilada d'eIF2 $\alpha$  i els nivells d'eIF2 $\alpha$  total amb anticossos específics. A la Figura-6B es pot veure que les cèl·lules Jurkat en estat basal tenien una petita quantitat d'eIF2 $\alpha$  fosforilat. Després del tractament amb aspirina es donava un increment transitori en la fosforilació d'aquest factor, que tenia lloc entre els 15 i 90 minuts de tractament. També vam veure que es donava un altre pic de fosforilació evident a les 4-5 hores de tractament amb aspirina, quan les caspases ja havien estat activades. Un cop analitzats els increments en la

fosforilació d'aquest factor, vam determinar la relació entre l'eIF2 $\alpha$  fosforilat i l'eIF2 $\alpha$  total, després de que les bandes fossin quantificades densitomètricament. La *ratio* obtinguda de la relació entre les dos formes del factor eIF2 $\alpha$ , la fosforilada respecte la total, mostrava clarament els pics de fosforilació d'aquest factor durant el tractament amb aspirina. Aquests resultats indiquen que l'aspirina inhibeix la síntesi proteica a les cèl·lules Jurkat, almenys en part, per la inducció de la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$ . Com a dada destacada, cal remarcar, que el pic transitori de fosforilació que té lloc al poc d'iniciar-se el tractament amb aspirina, es dona quan encara no s'han activat les caspases. No s'han dut a terme experiments per determinar altres efectes addicionals de l'aspirina sobre la maquinària de traducció o per determinar la taxa de renovació de la proteïna Mcl-1.

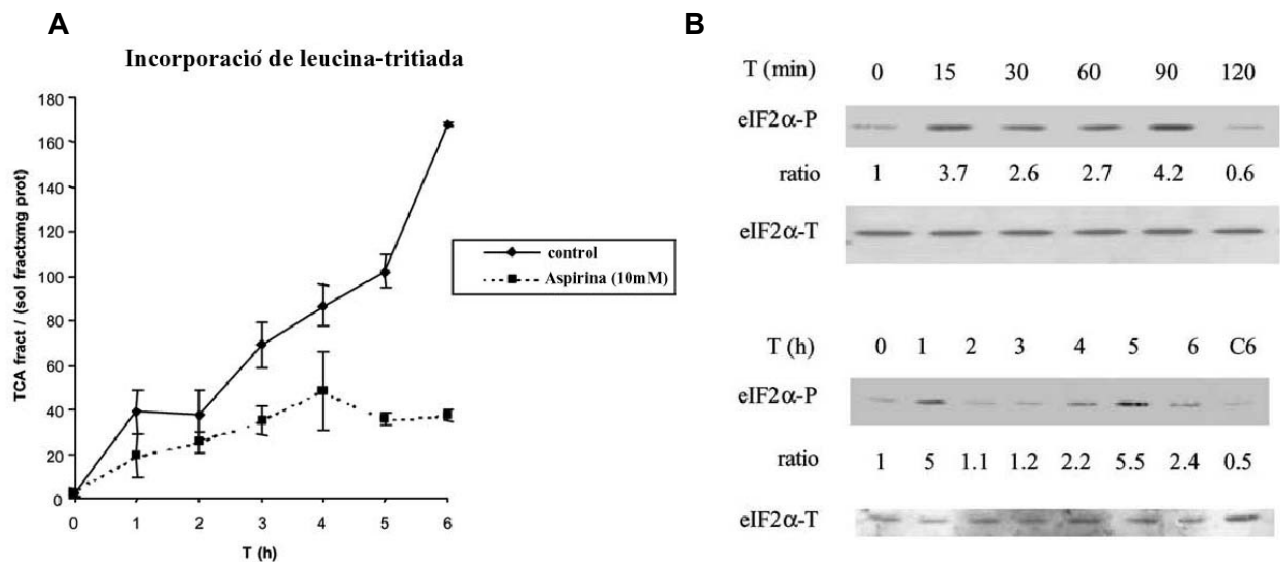


FIGURA-6. Anàlisi de la incorporació de leucina-tritiada i de la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  durant el tractament amb aspirina. (A) Les cèl·lules Jurkat, a una concentració de  $0.5 \times 10^6$  cèl·lules/ml, van ser incubades amb leucina-tritiada ( $[^3\text{H}]$ leucine, 42.5 Ci/mol) en absència o en presència d'aspirina (10 mM) durant 6 hores. Les cèl·lules ( $1 \times 10^6$  cèl·lules), es van recollir cada hora, per determinar la incorporació de leucina-tritiada a les proteïnes de la fracció precipitada de TCA. També es va quantificar la quantitat de leucina-tritiada a la fracció soluble. Els resultats s'expressen com a: cpm fracció TCA / (cpm fracció soluble  $\times$  mg proteïna), on cpm són les comptes per minut. S'ensenya un experiment representatiu de tres, i els valors són la mitjana  $\pm$  SEM de tres determinacions. (B) Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb aspirina (10 mM) durant diferents temps, es van recollir totes alhora, i 50  $\mu$ g de proteïna van ser analitzats per Western blot amb anticossos específics contra Ser<sup>51</sup>-forforilada del factor eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P) i per la forma total d'eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -T). Es van quantificar densitomètricament les bandes i s'expressen les ratios eIF2 $\alpha$ -P/ eIF2 $\alpha$ -T, normalitzades respecte el temps de 0 hores, entre els Western de la forma fosforilada i la total. C6 són cèl·lules incubades amb medi sense aspirina durant 6 hores.

## **2.6. Estudi de la regulació de la traducció en promotors CAP-dependents i en promotors CAP-independents.**

Els resultats presentats demostren que durant el tractament amb aspirina s'afecta l'inici de la síntesi proteica, per l'increment transitori en la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  que provoca el tractament. A la literatura està descrit que durant l'apoptosi, la traducció dels missatgers que tenen seqüències de regulació IRES (que tenen una traducció CAP-independent) esta menys afectada que la dels missatgers amb una traducció CAP-dependent (Holcik et al., 2000). Els elements de regulació IRES, formen estructures secundàries als missatgers, que possibiliten el reclutament dels ribosomes prop del codó d'inici de traducció, pel que no depenen de la maquinària convencional de síntesi proteica, així com tampoc es dona l'*scanning* dels ribosomes al llarg del missatger fins a trobar el punt d'inici de traducció.

### **2.6.1. Estudi de la regulació de diferents promotors.**

Amb l'objectiu d'investigar com s'afectaven els diferents mecanismes de traducció de proteïnes, vam estudiar com els tractaments amb les dues drogues inductores d'apoptosi afectaven la regulació de construccions de luciferasa sota control de diferents promotors que tenen una traducció dependent o independent de CAP. Al laboratori vam obtenir la construcció que porta la zona 5'-UTR (zona 5'-no traduïda, de *untranslated region*) d'XIAP, on suposàvem que hi havia el promotor d'aquest gen antiapoptòtic, davant del gen de la luciferasa. Aquesta construcció transfectada en cèl·lules Jurkat expressava una activitat luciferasa significativa, indicant la presència d'un promotor funcional. La construcció conté des del nucleòtid -3999 al -5, respecte l'origen de traducció descrit pel gen. En aquesta regió 5'-UTR del gen estava descrit que hi havia un element de regulació IRES, que possibilita una traducció CAP-independent (Holcik et al., 1999). Dades de la bibliografia demostraven que certes situacions d'estrès, com la deprivació de sèrum o la radiació- $\gamma$ , no feien variar l'expressió del gen *reporter* CAT (Cloranfenicol acetil transferasa) sota control de la regió 5'-UTR d'XIAP, o augmentava lleugerament, mentre que disminuïa molt l'activitat del mateix gen *reporter* sota control de promotors CAP-dependents per la seva traducció (Holcik et al., 1999; 2000). Es van fer experiments de transfecció en cèl·lules Jurkat amb la construcció que portava la regió 5'-UTR d'XIAP (que porta un element IRES) i diferents construccions de promotors que teníem al laboratori, com el d'Mcl-1, o d'altres promotors de gens no implicats en la regulació del procés d'apoptosi, com són el promotor de l'àcid gras sintasa (FAS, de *fatty acid sintetase*) i CMV

(citomegalovirus), que tenen una traducció CAP-dependent. Quan les cèl·lules Jurkat eren transfectades amb la construcció d'XIAP i tractades amb les dues drogues d'estudi, vam observar una marcada reducció de l'activitat luciferasa amb el tractament amb estaurosporina, però no amb el tractament amb aspirina (Figura-7A). Per altra banda, quan es van transfectar les cèl·lules amb les construccions dels promotors CAP-dependents, com són Mcl-1, FAS i CMV (Figura-7A), vam observar una reducció de l'activitat luciferasa, tant amb el tractament amb estaurosporina, com amb el tractament amb aspirina. Cal dir, que en tots els promotors analitzats s'observava aquesta reducció de l'activitat luciferasa durant el tractament de les cèl·lules amb les dues drogues, exceptuant a la construcció d'XIAP durant el tractament amb aspirina.

### **2.6.2. Estudi del missatger d'*xiap* endogen.**

Per investigar amb més profunditat aquests resultats obtinguts amb el promotor d'XIAP durant el tractament amb aspirina, vam estudiar l'efecte d'aquesta droga sobre els nivells de missatger i proteïna endògens d'*xiap*. El tractament amb aspirina no afectava ni els nivells de missatger ni els nivells de proteïna endògens d'XIAP (Figura-7B). Aquests resultats demostraven que durant el tractament amb aspirina els nivells de missatger d'*xiap* no eren modulats, com passava amb el missatger d'*mcl-1*, indicant que durant l'apoptosi, la inhibició transcripcional no sembla ser un fenomen general i inespecífic. Els resultats presentats, també suggereixen que l'aspirina disminueix els nivells de proteïnes amb vida mitja curta, tant implicades en el procés d'apoptosi (Mcl-1), com no implicades en aquest procés (luciferasa), mitjançant la inhibició de la síntesi proteica, més que alterant la taxa del recanvi proteic. El missatger d'*xiap*, que té una traducció CAP-independent, podria escapar d'aquesta inhibició de la síntesi proteica, ja que no requereix de la maquinària convencional de traducció, que es veuria afectada per l'entrada de la cèl·lula en apoptosi. La disminució dels nivells d'XIAP sembla important en alguns models d'apoptosi (Yang et al., 2000b), però al nostre model els nivells d'XIAP no són modulats durant el tractament amb aspirina.

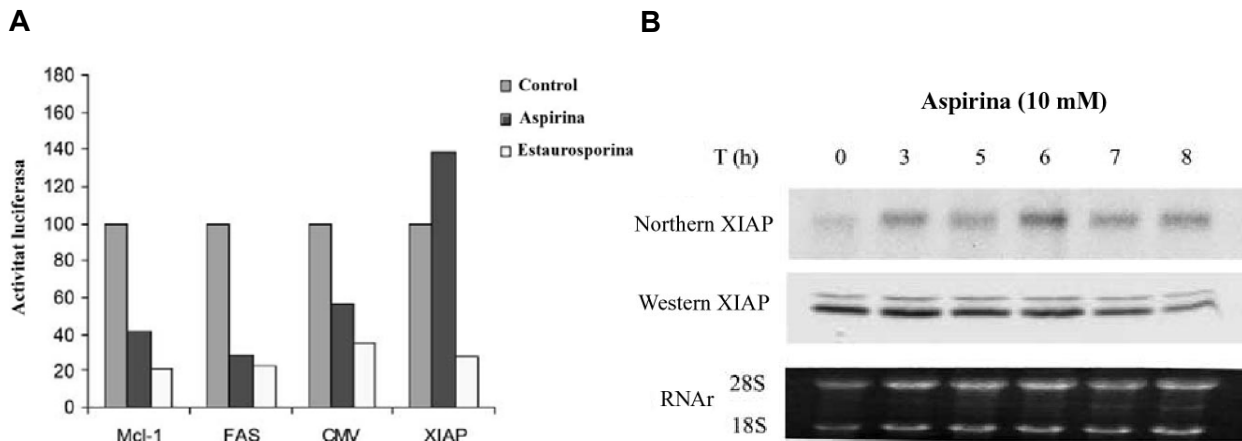


FIGURA-7. Regulació de la traducció en promotors CAP-dependents i en promotors CAP-independents. (A) Les cèl·lules Jurkat van ser transfectades per electroporació amb 2 µg de plàsmid *reporter* amb GFP (pEGFP-C1) i amb 10 µg dels següents promotors fusionats amb el gen *reporter* de la luciferasa: CMV, FAS, Mcl-1 i XIAP. 24 hores després de ser transfectades, les cèl·lules van ser tractades amb estaurosporina (1 µM) o aspirina (10 mM) durant 3 i 6 hores respectivament. Es va determinar l'activitat luciferasa segons s'explica als materials i mètodes. Els resultats s'expressen com a unitats de luciferasa relativa normalitzades per l'eficiència de transfecció i la concentració de proteïna. La gràfica representa els valors mitjans de dos experiments, normalitzats per cada construcció al valor d'activitat relativa de la construcció en absència de droga. (B) Anàlisi dels nivells de missatger i proteïna endògens d'XIAP a les cèl·lules Jurkat tractades amb aspirina. Les cèl·lules van ser tractades amb aspirina (10 mM) durant diferents temps i van ser recollides totes alhora; per cada condició, 15 µg d'RNA van ser assajats per quantificar els nivells de missatger per Northern blot amb una sonda específica del cDNA d'*xiap* marcada radioactivament amb fòsfor (*xiap* <sup>32</sup>P-cDNA), i 50 µg de proteïna per l'assaig de Western blot. Al Western blot d'XIAP apareix una banda inespecífica menys marcada a la part superior, que ens serveix de control de càrrega. S'ensenyen els nivells dels RNA ribosomals tenyits amb bromur d'etidi com a control de càrrega del Northern blot.

## **2.7. Anàlisi de si la caiguda d'Mcl-1 pot ser necessària per fer entrar les cèl·lules en apoptosi.**

### **2.7.1. Experiments amb l'inhibidor de la síntesi proteica cicloheximida.**

Els resultats presentats fins ara i el descrit a la bibliografia, semblen indicar que Mcl-1 és una proteïna antiapoptòtica de vida mitja curta, crítica per l'entrada de la cèl·lula en apoptosi. Ens vam preguntar quin seria l'efecte de la caiguda d'Mcl-1 sobre la viabilitat cel·lular. Per abordar aquest objectiu, vàrem tractar les cèl·lules Jurkat amb cicloheximida, un inhibidor general de la traducció, a dosis en que no s'afectava la viabilitat cel·lular. El tractament amb cicloheximida va reduir els nivells de la proteïna Mcl-1 (Figura-8A), d'una manera similar a com ho feia el tractament amb aspirina (Figura-8B). Per veure si això era un efecte específic sobre Mcl-1 o un efecte general, vam analitzar la regulació d'una proteïna que no estigués relacionada amb el procés d'apoptosi i que també tingués una vida mitja molt curta. Els nivells de la proteïna Id1, que té una vida mitja molt curta (Bounpheng et al., 1999), també eren clarament disminuïts durant els tractaments amb aspirina (Figura-8B) i cicloheximida (Figura-8A).

Els nivells de Bcl-2 no estaven afectats per cap dels dos tractaments. A més, la preincubació de les cèl·lules amb Z-VAD.fmk no protegia de la caiguda d'Mcl-1 induïda pel tractament amb cicloheximida (Figura-8C). Aquests resultats descartaven qualsevol efecte inespecífic del Z-VAD.fmk sobre la maquinària de traducció o degradació de proteïnes.

El conjunt de resultats demostren que el tractament amb aspirina disminueix els nivells de proteïnes amb vida mitja curta, com Mcl-1 i Id1, mitjançant la inhibició de la maquinària traduccional. També queda clar, amb els experiments fets amb cicloheximida, que la disminució dels nivells d'Mcl-1 no afecta la viabilitat cel·lular. Per tant, la desaparició d'Mcl-1 pot ser necessària, però no suficient, per disparar l'apoptosi induïda per aspirina o estaurosporina a les cèl·lules Jurkat.

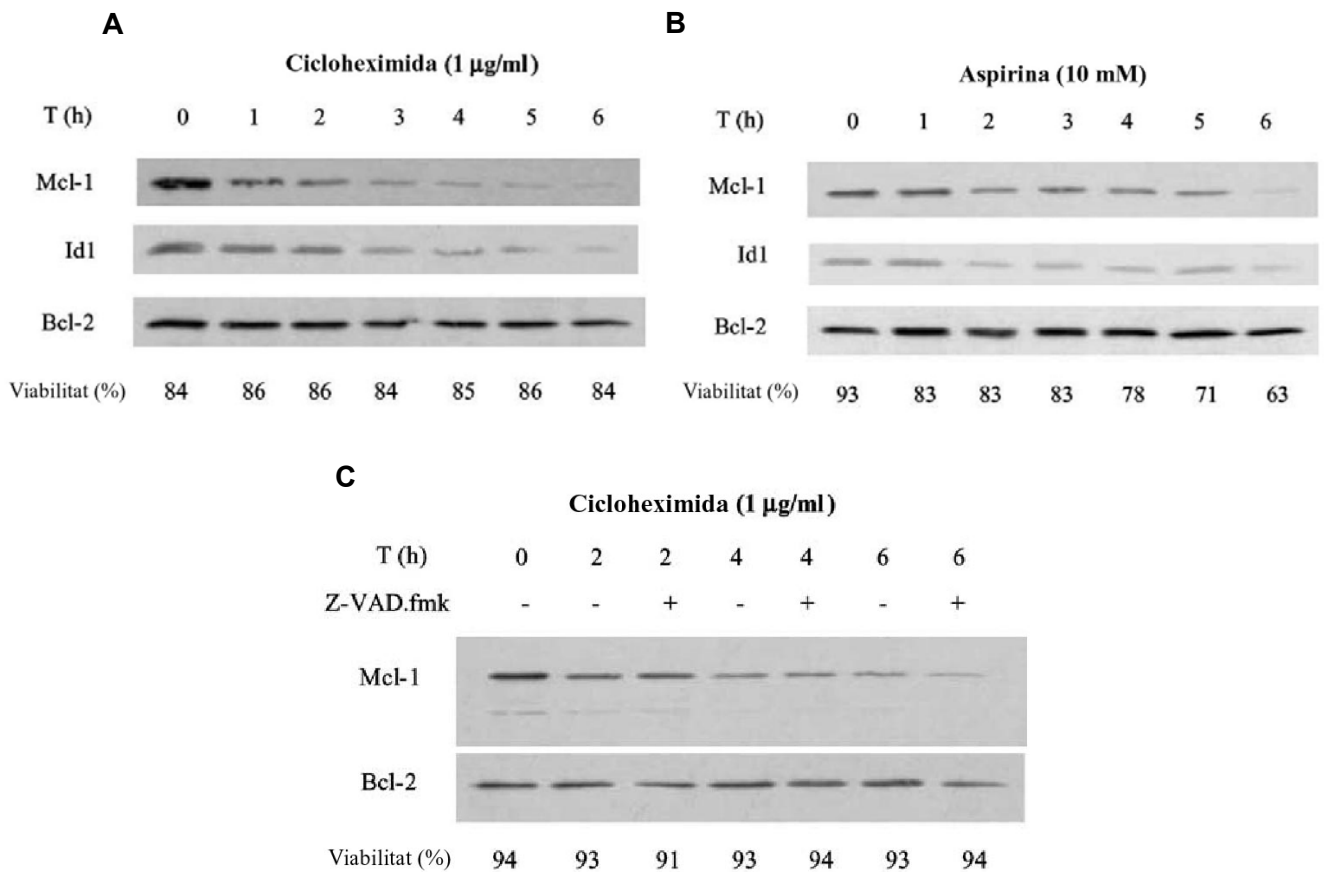


FIGURA-8. Anàlisi de la modulació dels nivells d'Mcl-1 en la viabilitat de les cèl·lules pel tractament amb cicloheximida. Les cèl·lules Jurkat ( $1 \times 10^6$  cèl·lules/ml) van ser tractades amb cicloheximida (1 µg/ml) (A) o amb aspirina (10 mM) (B), durant diferents temps. Les cèl·lules van ser recollides al mateix temps per l'anàlisi per Western blot de les proteïnes Mcl-1, Id1 i Bcl-2. (C) Efecte del Z-VAD.fmk en la caiguda d'Mcl-1 induïda pel tractament amb cicloheximida. Les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb cicloheximida (1 µg/ml) sola o en presència de l'inhibidor de caspases Z-VAD.fmk (200 µM) durant diferents temps. Les cèl·lules es van recollir al mateix moment per l'anàlisi per Western blot dels nivells d'Mcl-1 i de Bcl-2. En cada carril es carreguen 50 µg de proteïna. La viabilitat cel·lular de cada temps es mostra a la part inferior de cada figura.



### **3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS.**

En l'estudi presentat en el model de les cèl·lules Jurkat, es demostra que els nivells de la proteïna Mcl-1 són disminuïts ràpidament després del tractament de les cèl·lules amb dues drogues proapoptòtiques, com són l'estaurosporina i l'aspirina. En canvi, els nivells d'una altra proteïna antiapoptòtica de la mateixa família, Bcl-2, romanen constants durant tot el temps d'aplicació de les drogues, sense veure's afectats per l'entrada en apoptosi de les cèl·lules. Bcl-2 és una proteïna de vida mitja llarga, estimada entre 10 i 14 hores (Merino et al., 1994; Reed, 1996), mentre que la proteïna Mcl-1 té una vida mitja molt curta, que va des de 20 minuts a 3 hores, depenent del model d'estudi considerat (Yang et al., 1995; Schubert i Duronio, 2001). Cal destacar, que el descens d'Mcl-1 és paral·lel al descens de la viabilitat cel·lular, tot i que com s'ha demostrat, la caiguda dels nivells d'Mcl-1 a les cèl·lules Jurkat pot ser una condició necessària, però no suficient, per activar el procés de mort.

#### **MCL-1 COM A SENSOR DE LES ALTERACIONS CEL·LULARS.**

Mentre estàvem realitzant els darrers experiments d'aquest estudi i preparant el manuscrit del treball (del qual s'adjunta la publicació al final de la Tesi), va aparèixer un article d'especial rellevància. El grup de Xiaodong Wang va publicar un treball en el que es definia un nou paper a la proteïna Mcl-1, que encara li donava més pes en el control del procés d'apoptosi (Nijhawan et al., 2003). En aquest treball es descriu que durant l'apoptosi induïda per radiació ultraviolada a les cèl·lules Hela, la eliminació d'Mcl-1 és un fet necessari per desencadenar la sortida del citocrom-c del mitocondri i activar el procés d'apoptosi. Es suggereix un procés seqüencial de fets, que tenen lloc durant la inducció de l'apoptosi en aquest model i per aquest estímul. El detonant de que les cèl·lules entrin en apoptosi és l'aturada de la síntesi proteica que provoca l'estimulació amb radiació ultraviolada, que bloquejaria la síntesi de la proteïna Mcl-1. Els remanents de proteïna Mcl-1 que hi ha a la cèl·lula serien ràpidament degradats per la via del proteasoma; com que Mcl-1 és una proteïna de vida mitja molt curta i la síntesi està bloquejada, de seguida decaurien els nivells proteics d'Mcl-1. Només quan han caigut els nivells d'Mcl-1, es podria donar la translocació de Bcl-X<sub>L</sub> i Bax al mitocondri, l'oligomerització amb Bak, i la sortida del citocrom-c. Es proposa que la proteïna Mcl-1 podria ser un sensor de la inhibició de la síntesi proteica, i la caiguda d'Mcl-1 podria ser necessària per desencadenar l'apoptosi.

## **MCL-1 I EL PROTEASOMA.**

Els resultats existents a la bibliografia demostren que Mcl-1 és poliubiquïtinitzat i degradat per la via del proteasoma. Els inhibidors del proteasoma (com MG132, MG115 o lactacistina) bloquegen eficaçment la degradació d'Mcl-1, així com també bloquegen l'apoptosi induïda per actinomicina-D (Zhang et al., 2002), per radiació ultraviolada (Nijhawan et al., 2003), o pel lipopolisacàrid (Bannerman et al., 2001). En el nostre model, l'inhibidor del proteasoma MG132 només bloqueja parcialment la caiguda d'Mcl-1, tot i que també indueix pèrdua de la viabilitat cel·lular, el que podria explicar aquesta protecció parcial del descens d'Mcl-1. A la bibliografia es troben articles on es descriu que els inhibidors del proteasoma poden induir apoptosi en les cèl·lules Jurkat (Morley i Pain, 2001; An et al., 2000). En altres models cel·lulars, els inhibidors del proteasoma només protegeixen parcialment de l'apoptosi induïda per estaurosporina (Bannerman et al., 2001; Brophy et al., 2002), fet que estaria molt d'acord amb els resultats presentats en el nostre estudi.

La disminució dels nivells d'Mcl-1 durant l'entrada de les cèl·lules en apoptosi que hem vist en el nostre estudi, està d'acord amb molts altres estudis on es descriu el mateix, la caiguda d'aquesta proteïna en els estadis més primerencs del procés d'apoptosi (Chao et al., 1998; Lomo et al 1996; Altmeyer et al., 1997; Kitada et al 1998; Bellosillo et al., 1999; Klampfer et al., 1999; Kitada et al., 2000; Byrd et al., 2002). Aquesta disminució dels nivells d'Mcl-1, associada sens dubte a l'aturada de la síntesi proteica, podria tenir una rellevància especial en l'entrada de la cèl·lula en el procés de mort. A diferents models cel·lulars s'ha descrit que el detonant que activa l'apoptosi pot ser l'alteració dels nivells dels membres antiapoptòtics i membres proapoptòtics de la família de Bcl-2, on Mcl-1 podria jugar un paper cabdal (Gomez-Bougie et al., 2004, 2005). Les proteïnes antiapoptòtiques de vida mitja curta, com Mcl-1, són mediadors importants de l'apoptosi, ja que s'espera que siguin ràpidament eliminades quan es dona l'inhibició traduccional.

## MODULACIÓ DEL MISSATGER D'MCL-1.

Durant el tractament de les cèl·lules amb estaurosporina, els nivells de missatger d'*mcl-1* mostren un ràpid descens, paral·lelament a la disminució dels nivells de proteïna. A la bibliografia està descrit que el missatger d'*mcl-1* té una vida mitja molt curta, de menys de 2 hores (Yang et al., 1996). El missatger d'*mcl-1* conté una regió 3'-UTR molt llarga, de 2.8 kb, que conté múltiples seqüències de desestabilització de l'RNAm (Kozopas et al., 1993). En el nostre estudi no hem dut a terme cap experiment per determinar si durant l'apoptosi induïda per estaurosporina estaven afectats els missatgers per processos de desestabilització. S'ha descrit, que en certes condicions apoptòtiques, es produeix una disminució en l'activitat transcripcional del promotor d'*mcl-1*, que explicaria el descens observat a nivell de proteïna (Cuconati et al., 2003). En canvi, durant el tractament de les cèl·lules amb aspirina no s'afecten els nivells de missatger, tot i que tant els nivells de proteïna com la viabilitat cel·lular es veuen disminuïdes, suggerint una ràpida inhibició de la traducció durant el tractament. Aquests resultats posen de manifest que la inhibició transcripcional no és un procés general associat a l'apoptosi.

## DISMINUCIÓ D'MCL-1 I ACTIVACIÓ DE LES CASPASES.

En el nostre estudi hem analitzat la implicació de les caspases en la disminució del missatger i la proteïna d'Mcl-1 durant els tractaments amb les dues drogues. Sembla que en la inducció d'apoptosi per les dues drogues hi prenen part tant vies dependents de l'activació de les caspases com vies independents de l'activació d'aquestes. L'inhibidor general de caspases Z-VAD.fmk, tot i que evita l'activació de les caspases i la caiguda de la viabilitat cel·lular, només pot revertir parcialment la caiguda de la proteïna Mcl-1 induïda per estaurosporina o aspirina, indicant que la disminució dels nivells proteics d'Mcl-1 no és només conseqüència de l'activació de les caspases. A la bibliografia està descrit que la proteïna Mcl-1 és substrat directe de caspases durant l'apoptosi induïda per Fas (Herrant et al., 2002), i que això pot afectar la seva capacitat d'unió a diferents molècules proapoptòtiques com BIM (Herrant et al., 2004). La degradació d'Mcl-1 per caspases pot generar diferents formes truncades de la proteïna, on es perden les regions PEST, però que no sembla que tinguin alterada la seva estabilitat. Hi ha discrepàncies en la funcionalitat d'aquestes formes truncades d'Mcl-1 generades durant l'apoptosi (Clohessy et al., 2004; Weng et al., 2005). En el nostre treball es demostra que durant l'apoptosi, hi ha vies independents de l'activació de les caspases que són responsables de la disminució dels nivells d'Mcl-1. Un

resultat molt interessant, és que la disminució dels nivells de missatger induïts per estaurosporina sigui totalment bloquejada per Z-VAD.fmk, demostrant un mecanisme totalment dependent de l'activació de les caspases. L'estaurosporina és un potent inhibidor de diferents proteïnes quinases, i està descrit que inhibeix la transcripció de diferents gens (Rigaut et al., 1993; Erdos et al., 1994; Desai et al., 1995). En el nostre estudi no s'han fet experiments per determinar si l'estabilitat del missatger d'*mcl-1* estava afectada durant l'apoptosi induïda per estaurosporina. Tot i la reversió de la caiguda del missatger d'*mcl-1* per Z-VAD.fmk en l'apoptosi induïda per estaurosporina, l'inhibidor de caspases no és capaç de revertir totalment la caiguda de la proteïna, el que suggereix l'existència d'un mecanisme de control traduccional independent de l'activació de les caspases. Està descrit que l'estaurosporina inhibeix la síntesi proteica en diferents models cel·lulars (Sedlak et al., 1995; Hanada et al., 1998), degut al processament del factor eIF4G per la caspasa-3 (Bushell et al., 1999) i per la inducció de la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  després de l'activació de les caspases (Saelens et al., 2001). A les cèl·lules Jurkat s'ha descrit que alguns estímuls apoptòtics indueixen la degradació, dependent de l'activació de les caspases, dels factors polipeptídics d'iniciació eIF4G i eIF4B (Clemens et al., 1998; Bushell et al., 2000).

Els nostres resultats estan d'acord amb el publicat a la bibliografia, però a més, suggereixen un mecanisme addicional d'inhibició de la traducció independent de l'activació de les caspases. Està descrit que la inhibició de la PKC per estaurosporina disminueix la síntesi de lipoproteïna lipasa per inhibició de la traducció (Ranganathan et al., 1999), i també que l'estaurosporina inhibeix la fosforilació de reguladors traduccionals lligats a mTOR per mecanismes independents de l'activació de les caspases (Tee et al., 2001). Per tant, és possible que l'estaurosporina, mitjançant la seva capacitat d'inhibir diferents quinases cel·lulars, controli la síntesi proteica de la cèl·lula de manera independent de l'activació de les caspases. L'estudi de la proteïna Mcl-1 en l'apoptosi induïda per estaurosporina i aspirina en les cèl·lules Jurkat, ens ha portat a elaborar un model del mecanisme d'acció de les dues drogues (veure el model de la Figura-9). Durant l'apoptosi induïda per estaurosporina es superposen els efectes a nivell transcripcional i traduccional, el que fa més difícil l'estudi i la interpretació dels resultats.

## INHIBICIÓ DE LA SÍNTESI PROTEICA PER ASPIRINA.

Els nostres resultats han demostrat que hi ha un control traduccional d'Mcl-1 durant l'apoptosi induïda per aspirina, i que és independent de l'activació de les caspases. A la bibliografia està descrit que una vegada s'ha activat la caspasa-3 per diferents estímuls apoptòtics, es reprimeix tota la maquinària de síntesi proteica de la cèl·lula (Clemens et al., 2000). Això està d'acord amb els nostres resultats, que han confirmat per diferents mètodes, que el tractament amb aspirina inhibeix la síntesi proteica en les cèl·lules Jurkat. En el moment de fer els experiments d'incorporació de leucina-tritiada durant el tractament de les cèl·lules amb aspirina, només hi havia un treball a la literatura on es descrivís la inhibició de la síntesi proteica per aspirina, però en el que no s'aprofundia ni en el mecanisme molecular, ni es feia un estudi detallat de com té lloc aquesta inhibició en el temps (Kwon et al., 1997). L'experiment d'incorporació de leucina-tritiada durant el tractament amb aspirina, és una mesura real de la taxa de síntesi proteica *de novo*. Hem vist com a les cèl·lules tractades amb aspirina es produeix una ràpida inhibició de la síntesi proteica, tant sols 1 hora després d'iniciar el tractament amb aspirina, quan les caspases encara no estan activades ni s'ha afectat la viabilitat cel·lular. En resultats anteriors del nostre laboratori, havíem descrit també en cèl·lules Jurkat, que les caspases 8, 9 i 3 eren activades a les 3 hores de tractament amb aspirina, simultàniament a la sortida del citocrom-c del mitocondri (Piqué et al., 2000). Els resultats presentats mostren clarament que hi ha una fosforilació transitòria del factor eIF2 $\alpha$  entre els 15 i 90 minuts després d'haver iniciat el tractament amb aspirina, quan encara no s'han activat les caspases (Figura-6B). La fosforilació d'una petita fracció del factor eIF2 $\alpha$  cel·lular és suficient per aturar la maquinària d'inici de traducció (Safer et al., 1983). En cèl·lules Jurkat s'ha descrit que l'apoptosi induïda per l'activació del receptor Fas/CD95 promou un increment transitori i primerenc dels nivells d'eIF2 $\alpha$  fosforilat, que va acompanyat d'una inhibició de la traducció cel·lular (Morley et al., 2000). Encara no es coneix el mecanisme de fosforilació d'eIF2 $\alpha$  independent de l'activació de les caspases. En el nostre estudi també s'ha observat la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  a les 4-5 hores de tractament amb aspirina, quan les caspases ja han estat activades (Figura-6B). S'ha descrit que durant l'apoptosi hi ha una activació de la proteïna quinasa PKR depenent de l'activació de les caspases, que indueix la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  (Saelens et al., 2001). Un mecanisme semblant a aquest podria ser el responsable de la fosforilació tardana del factor eIF2 $\alpha$  observat a les cèl·lules Jurkat tractades amb aspirina.

## MISSATGERS DEPENDENTS I INDEPENDENTS DE CAP.

Els experiments de transfecció amb les construccions de diferents promotors davant del gen de la luciferasa, mostren que tant el tractament amb estaurosporina com amb aspirina disminueixen l'activitat luciferasa, descens que pot ser explicat tant per una inhibició transcripcional com per una inhibició traduccional. Tot i no poder diferenciar aquests dos efectes en la majoria de promotors utilitzats en l'estudi, quan es va assajar la construcció que portava la regió 5'-UTR d'XIAP, on està descrit que hi ha un element de regulació IRES que confereix resistència a la parada de la síntesi proteica (Holcik et al., 2000), no es va observar disminució de l'activitat luciferasa després del tractament amb aspirina (Figura-7A). En canvi, l'estaurosporina produeix disminució de l'activitat luciferasa en tots els promotors assajats, inclòs XIAP. Quan es dona l'aturada en la síntesi proteica, els missatgers que tenen una traducció CAP-independent sembla que escaparien a aquesta inhibició, i podria ser una estratègia per mantenir la síntesi d'algunes proteïnes antiapoptòtiques com XIAP, que permetrien a la cèl·lula sobreviure temporalment en diferents situacions d'estrès. Tot i això, en el model plantejat sembla haver-hi una paradoxa. El factor eIF2 $\alpha$  sembla ser necessari tant per la traducció CAP-dependent com per la traducció CAP-independent, ja que és essencial pel reclutament del tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (l'RNA de transferència que porta la metionina) i el ribosoma. A més, s'ha descrit que altres reguladors apoptòtics, com Fas i Bax, incrementen la seva expressió després de la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  (Balachandran et al., 1998). Sembla clar, que els diferents missatgers poden tenir diferent afinitat per la maquinària ribosomal funcional que hi ha a la cèl·lula, tot i que encara no es coneixen els mecanismes implicats (Dever, 2002). També s'ha descrit que la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  és necessària per l'activació dels elements IRES cel·lulars (Gerlitz et al., 2002).

## MCL-1 I LA VIABILITAT CEL·LULAR.

Hem demostrat, amb els experiments amb cicloheximida, que la disminució dels nivells d'Mcl-1 no es correlaciona necessàriament amb la caiguda de la viabilitat cel·lular. Per tant, el paper d'Mcl-1 en l'apoptosi de les cèl·lules Jurkat induïda per aspirina i estaurosporina és incert, pel què es necessitarien altres experiments per aclarir la funció d'aquesta proteïna en l'apoptosi d'aquestes cèl·lules. Amb els resultats obtinguts del nostre estudi, només podem assegurar que la caiguda d'Mcl-1 pot ser necessària, però no suficient, per induir el procés d'apoptosi en les cèl·lules Jurkat.

## CONCLUSIONS.

D'aquest treball realitzat en les cèl·lules Jurkat, on hem estudiat la regulació del gen Mcl-1 durant l'apoptosi induïda per estaurosporina i aspirina, podem extreure com a conclusions generals, que durant el procés d'apoptosi tenen lloc diferents patrons de control transcripcional i traduccional dels gens depenent de l'estímul utilitzat, tot i que una parada en la síntesi proteica sembla ser una característica comuna a tots els processos de mort cel·lular (veure model de la Figura-9).

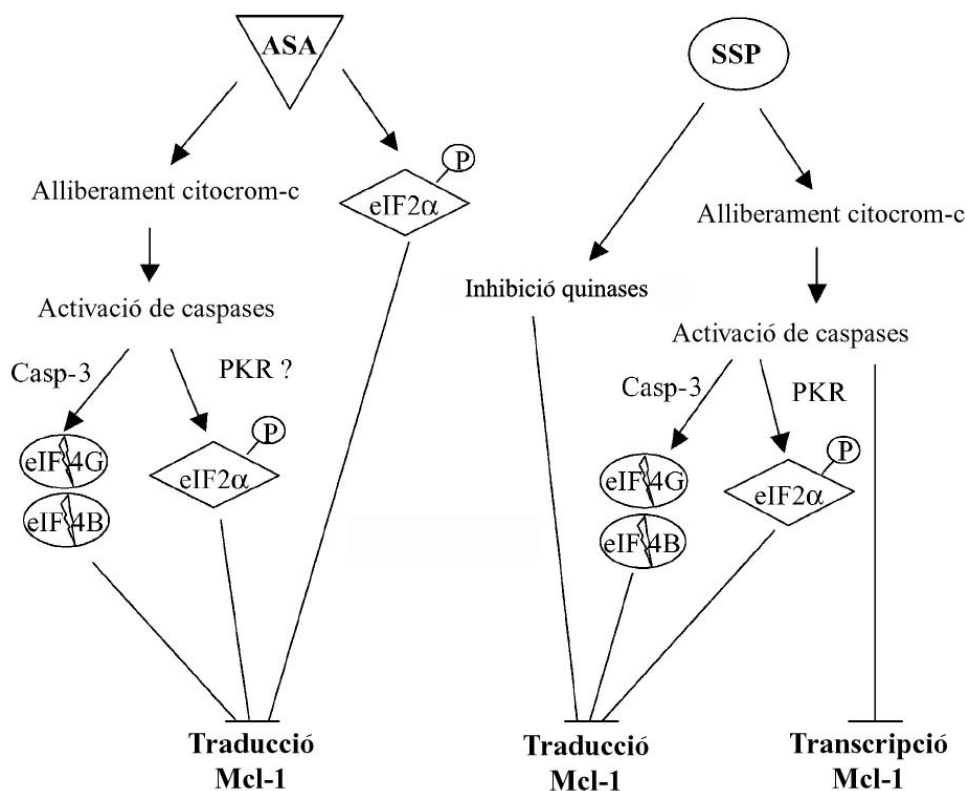


FIGURA-9. Model del control transcripcional i traduccional d'Mcl-1 durant l'apoptosi induïda per aspirina i estaurosporina. Els nivells de la proteïna Mcl-1 són disminuïts després d'afegir aspirina (ASA) en el medi, tant per mecanismes dependents com independents de l'activació de les caspases. Les vies independents de caspases podrien tenir lloc per la ràpida fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  (que ja es dona als 15 minuts) i la conseqüent parada de la traducció cel·lular. Les vies dependents de l'activació de les caspases, activades després de la sortida del citocrom-c del mitocondri (a les 2-3 hores de tractament amb aspirina), podrien induir la proteòlisi dels factors iniciadors de la traducció eIF4G i eIF4B, i la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$  (probablement per la proteòlisi de PKR). El tractament amb estaurosporina (SSP) també induïx la inhibició de la síntesi proteica per vies dependents e independents de l'activació de les caspases. Les vies dependents de l'activació de les caspases serien iguals a les descrites en el model de l'aspirina, que necessitarien de l'alliberament del citocrom-c del mitocondri. Les vies independents de l'activació de les caspases podrien ser controlades per la inhibició de quinases. A més, l'estaurosporina, però no l'aspirina, induïx la inhibició transcripcional d'Mcl-1 per un mecanisme dependent de l'activació de les caspases.

Els nostres resultats demostren que durant l'apoptosi, la inhibició de la transcripció no és un fenomen general i inespecífic, ja que el tractament amb aspirina no afecta els nivells de missatger d'Mcl-1 i d'XIAP, tot i que la viabilitat cel·lular ha caigut i les caspases han estat activades. Per tant, pels nostres resultats i els d'altres grups, cada cop està més clar que el control de la traducció juga un paper molt important durant el procés d'apoptosi, pel que cal tenir-ho en compte en el disseny de drogues més efectives per induir apoptosi a les cèl·lules tumorals. En el model de les cèl·lules Jurkat, la caiguda dels nivells de Mcl-1 pot ser necessària, però no suficient, per induir el procés d'apoptosi.



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



## **ANÀLISI D'INSERCIONS AL PROMOTOR D'MCL-1 EN CÈL·LULES DE LLC-B.**

### **1. INTRODUCCIÓ.**

#### **Insercions al promotor d'*mcl-1*.**

Recentment, el grup del Dr. Saxena ha publicat un treball on es descriuen unes insercions de 6 (GGCCCC) o 18 (GGCTCAGGCCCGGCC) nucleòtids al promotor d'*mcl-1* a les cèl·lules B d'aproximadament el 30% de pacients amb leucèmia limfàtica crònica, que farien incrementar tant els nivells de missatger com de proteïna (Moshynska et al., 2004). Aquesta seria l'anomalia genètica més freqüent que explicaria els augments d'un membre de la família de Bcl-2 en cèl·lules de LLC-B. En aquest treball es descriu que aquestes insercions, que sempre es donen al mateix punt del promotor d'*mcl-1*, són específiques de la població de limfòcits-B de pacients amb LLC-B, i que són alteracions somàtiques. Mitjançant un estudi comparatiu de la presència de les insercions a mostres de DNA genòmic de pacients amb LLC-B i d'individus normals, es descarta la possibilitat que sigui un polimorfisme hereditari, ja que aquestes insercions no es troben en cap dels 18 individus sans controls analitzats, i si en 17 dels 58 pacients de LLC-B. Tampoc es van trobar les insercions a mostres de teixit de tiroide i de mama normals de dos pacients amb LLC-B que tenien les insercions. Per tant els autors van suggerir l'especificitat de la presència de les insercions en les cèl·lules B de pacients de LLC-B.

En aquest estudi es descriu que aquestes insercions al promotor d'*mcl-1* porten a incrementar els nivells de proteïna i de missatger, 1,8 i 3 vegades respectivament, comparant-los amb els pacients que no la tenen o en línies cel·lulars derivades de limfomes que no la tenen, com la línia RL. Quan s'analitzen els nivells de proteïna i missatger a la línia BC-3, que té la inserció de 6 nucleòtids, tenen incrementats els nivells de missatger un 50% i els de proteïna un 40%, comparant-los amb els de la línia RL.

Tot i que la presència de les insercions està associada a nivells alts de missatger i de proteïna, no hi ha una relació causa-efecte directa. Per tant, encara que les insercions puguin contribuir a incrementar els nivells de missatger i proteïna, són insuficients per explicar els alts nivells d'expressió d'Mcl-1 en les cèl·lules de LLC-B, a més, no s'ha fet cap assaig funcional per demostrar si les insercions confereixen un increment en l'activitat transcripcional d'*mcl-1* (Kitada et al., 2004). Tot i que no es fan estudis

funcionals, es descriuen algunes possibles seqüències *consensus* d'unió de factors de transcripció fent una recerca a la base TFSearch. S'hi troben les seqüències de factors com CRE-BP, NF-κB, Ets, Sp1, SRE i STATx, en una zona on la cromatina té una configuració oberta que permet l'accés d'aquests factors. No s'ha descrit cap seqüència per aquests factors en els fragments de 6 o 18 nucleòtids inserits. En aquesta regió on es donen les insercions, és una regió propera al lloc d'unió del factor GM-CSF, un regulador antiapoptòtic que estimula transcripcionalment a *mcl-1*, pel què és una regió molt important en el control d'aquest gen (Chao et al., 1998; Corcione et al., 1997; Akgul et al., 2000).

La presència d'aquestes insercions també està associada a una major resistència a la quimioteràpia, a una ràpida progressió de la malaltia i a una baixa supervivència dels pacients. Això fa que sigui un clar paràmetre per identificar a un grup de pacients de LLC-B d'elevat risc (Moshynska et al., 2004).

## **2. RESULTATS.**

Per tant, per nosaltres era molt interessant estudiar quins dels nostres pacients tenien aquestes insercions, tant per l'estudi de l'evolució clínica d'aquests, com per entendre la diferent resposta que presenten als tractaments. Per confirmar la presència d'aquestes insercions en les mostres de LLC-B, vam dissenyar uns *primers* per amplificar per PCR un fragment de 99 parells de bases de la regió del promotor d'*mcl-1* on hi havia el lloc d'inserció dels fragments descrits. En el cas que hi hagués la inserció de 6 o de 18 parells de bases, amplificaríem un fragment de 105 o 117 parells de bases respectivament, que podien ser detectats mitjançant un anàlisi electroforètic. Vam començar a extreure el DNA genòmic dels diferents pacients de LLC-B que ens anaven arribant, per analitzar si tenien o no la inserció. Dels 26 pacients analitzats, vam trobar 10 individus que presentaven les insercions, que representa un 38,5% dels individus analitzats. En dos dels pacients es va trobar la inserció de 6 nucleòtids en heterozigosi, en un la inserció de 6 nucleòtids en homozigosi, en cinc la inserció de 18 nucleòtids en heterozigosi, i dos dels pacients eren heterozigots per les dues insercions (Veure la Taula-1). Les insercions van ser confirmades per seqüenciació després d'eluir i purificar les bandes del gel (Figura-10).

Vam voler corroborar que les insercions no estaven presents en la població d'individus sans, tal i com es publicava al treball de Moshynska et al. Amb aquest objectiu es van obtenir sangs de diferents individus, que en principi no estaven afectats per cap tipus de leucèmia, i vam analitzar la presència de les insercions. Cal dir, que a diferència de les mostres de pacients de LLC-B, la població cel·lular més abundant en les cèl·lules mononucleades d'aquests individus és la de limfòcits T, i no pas limfòcits B. Per sorpresa nostra, dels 10 individus analitzats, en quatre d'ells vam trobar la presència de les insercions, que representa un 40% dels individus sans analitzats. En un dels individus es va trobar la inserció de 6 nucleòtids en heterozigosi, en dos la inserció de 18 nucleòtids en heterozigosi, i un dels individus era heterozigot per les dues insercions (Veure la Taula-1 i Figura-10). Aquests resultats ens van fer pensar en la possibilitat que aquestes insercions no fossin específiques dels limfòcits B i no estiguessin associades només als pacients amb LLC-B, i que es tractés d'un polimorfisme present a la població general i no només a la leucèmica. Per tant, no es tractaria d'alteracions somàtiques sinó hereditàries.

Per demostrar que era un polimorfisme, només ens calia trobar la presència de les insercions en un teixit diferent al sanguini en individus sans. Vam efectuar un raspat de cèl·lules de l'epiteli de la paret de la cavitat bucal de 10 individus del nostre laboratori, i en vam extreure el DNA genòmic per fer les determinacions de les insercions per PCR. Es van trobar les insercions en 6 dels individus analitzats. En tres mostres es va trobar la inserció de 6 nucleòtids en heterozigosi, en dos la de 18 nucleòtids en heterozigosi i en una la de 18 nucleòtids en homozigosi (veure la Taula-1 i Figura-10). La seqüenciació de les bandes va confirmar la presència dels 3 al·lels a la població.

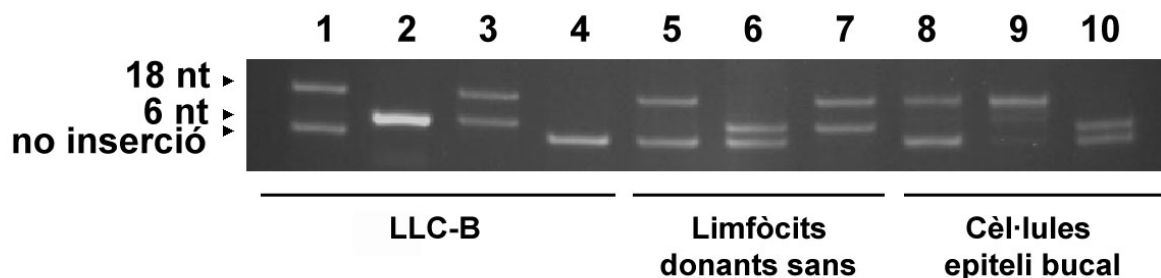


FIGURA-10. Diferents patrons al·lèlics de les insercions al promotor d'*mcl-1*. Es mostra l'anàlisi per electroforesi, en gels d'acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 10 %, de les amplificacions del DNA genòmic per PCR de diferents mostres representatives: 4 mostres de DNA genòmic de limfòcits de pacients de LLC-B, 3 de mostres de DNA genòmic de limfòcits d'individus sans i 3 mostres de DNA genòmic de cèl·lules de l'epiteli bucal d'individus sans. Es poden veure tres patrons al·lèlics, sense inserció, amb la inserció de 6 nucleòtids i amb la inserció de 18 nucleòtids.

Patrons de les combinacions al·lèliques	LLC-B (n=26)	CONTROLS		
		Limfòcits (n=10)	Cèl·lules de l'epiteli bucal (n=10)	Total (n=20)
Números de cada combinació al·lèlica				
-/-	16	6	4	10
-/6	2	1	3	4
-/18	5	2	2	4
6/6	1	0	0	0
6/18	2	1	0	1
18/18	0	0	1	1
Freqüències del polimorfisme				
No inserció	39 (75%)	15 (75%)	13 (65%)	28 (70%)
Inserció de 6 nucleòtids	6 (11.5%)	2 (10%)	3 (15%)	5 (12.5%)
Inserció de 18 nucleòtids	7 (12.5%)	3 (15%)	4 (20%)	7 (17.5%)
% al·lèls amb insercions	25%	25%	35%	30%

- : no inserció.

6 : inserció de 6 nucleòtids

18 : inserció de 18 nucleòtids

TAULA-1. Anàlisi de la presència de les insercions al promotor d'*mcl-1* en les mostres analitzades. En la part superior de la Taula s'analitzen els diferents patrons de combinacions al·lèliques trobades. La segona columna correspon a l'anàlisi del DNA de les cèl·lules mononucleades, que són majoritàriament limfòcits B, de pacients amb LLC-B; la tercera columna correspon a l'anàlisi del DNA de les cèl·lules sanguínies d'individus sans, que són majoritàriament limfòcits T i monòcits; i la quarta columna correspon a l'anàlisi del DNA de cèl·lules de l'epiteli de la cavitat bucal d'individus sans. En l'última columna es tracten conjuntament els dos grups de mostres control (mostres de limfòcits més epiteli bucal). En la part inferior de la Taula s'analitzen les freqüències al·lèliques del polimorfisme en les diferents poblacions analitzades.

### **3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS**

Els resultats presentats sobre l'anàlisi de la presència de les insercions de 6 i 18 nucleòtids al promotor d'*mcl-1* a la població d'individus amb LLC-B, ha confirmat la presència d'aquestes, però no com un tret distintiu d'aquesta població. El fet que trobem la presència de les insercions en cèl·lules sanguínies i en cèl·lules de l'epiteli de la paret de la cavitat bucal d'individus sans, argumenta en contra dels resultats publicats (Moshynska et al., 2004), i demostra que la presència de les insercions no és exclusiva dels limfòcits B de pacients amb LLC-B. Els resultats presentats a la Taula-1, confirmen la presència de les insercions tant en individus leucèmics com controls, amb una freqüència d'aparició molt semblant. A més, les diferents combinacions al·lèliques d'aquest polimorfisme es troben presents a totes les mostres analitzades. De fet, quan es comparen les freqüències al·lèliques entre les mostres de LLC-B i control, s'obtenen percentatges semblants als dos grups (sobretot si s'analitzen conjuntament els dos grups de mostres control. Veure l'última columna de la Taula-1). Com que la freqüència dels tres al·lèls és gairebé igual en els individus amb leucèmia i els controls, creiem que aquestes insercions al promotor d'*mcl-1* representen un polimorfisme hereditari present a la població.

Al nostre estudi no hem analitzat si la presència de les insercions al promotor d'*mcl-1* d'aquests individus, tant leucèmics com controls, estan associades a nivells més alts de missatger i de proteïna d'Mcl-1, respecte als individus que no la tenen. Tampoc hem analitzat si es dona una major resistència a la quimioteràpia, una ràpida progressió de la malaltia o una menor supervivència als pacients de LLC-B que les tenen. Recentment s'ha publicat un treball on s'analitza la presència de les insercions al promotor d'*mcl-1* i la correlació amb la progressió de la malaltia, en mostres de 173 individus amb LLC-B i en 105 individus control. Els resultats presentats demostren la presència de les insercions en el 61% de la població leucèmica i en el 69% de la població control, proporcions molt més elevades que les trobades al treball de Moshynska et al. i les obtingudes per nosaltres, amb una distribució i freqüència al·lèlica molt semblant en les dues poblacions. En aquest estudi es suggereix que les diferències trobades entre la població leucèmica que s'ha analitzat i la població leucèmica del treball de Moshynska et al., poden ser degudes a diferències en el *background* genètic de les dues poblacions d'estudi. Tampoc s'ha trobat correlació entre la presència de les insercions i l'estat mutacional de les immunoglobulines, l'estadi de Binet, o la supervivència dels diferents pacients analitzats (Tobin et al., 2005).

Per tant, pels nostres resultats i pels publicats per Tobin et al., sembla clar que les insercions al promotor d'*mcl-1* són un polimorfisme present a la població general, que no està associat a la població de pacients amb LLC-B o a una població de risc, i la seva rellevància en la patogènesi de la LLC-B caldria que tornés a ser avaluada. No tenim cap argument per explicar la discrepància entre els nostres resultats i els publicats per Moshynska et al., a no ser que sigui per problemes tècnics o en el tractament de les mostres control. És important entendre la regulació del gen *mcl-1* en les cèl·lules primàries de pacients amb LLC-B, ja que nivells alts d'aquesta proteïna s'han associat a una fallida per aconseguir una resposta completa al tractament. Uns nivells baixos d'Mcl-1, tot i que no poden garantir una resposta completa, sembla ser el requeriment necessari per aconseguir-la (Saxena et al., 2004).



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



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

### **1. INTRODUCCIÓ.**

El gen *bim* és un membre proapoptòtic de la família de Bcl-2 que va ser descrit fa relativament poc (O'Connor et al., 1998). Recentment ha pres una gran rellevància en el control del procés apoptòtic en diferents models, on juga un paper central com a mediador del procés en condicions d'estrès cel·lular i de pèrdua dels senyals de supervivència. En el moment d'iniciar aquest treball, ni al nostre grup ni al nostre model cel·lular, les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica, s'havia estudiat aquest gen, per la qual cosa era un molt bon candidat per fer-ho.

L'objectiu que ens vam plantejar va ser estudiar la modulació dels nivells de BIM, tant a nivell transcripcional com traducciona, i les vies implicades en la seva regulació. L'estudi s'ha fet en condicions on s'afavoreix la supervivència de les cèl·lules per diferents factors, o en condicions d'inducció d'apoptosi per diferents agents utilitzats al laboratori i a la teràpia de la LLC-B. Es tracta de saber si *bim* és un gen clau en la regulació de l'apoptosi en aquestes cèl·lules.

Tot i que hi ha descrites moltes isoformes de BIM, com s'ha explicat a la Introducció de la Tesi, a la majoria d'estudis es fa referència a les tres isoformes majoritàries degudes a *splicing* alternatiu, que són BIM<sub>EL</sub>, BIM<sub>L</sub> i BIM<sub>S</sub> (de *extralong*, *long* i *short*, respectivament), les tres amb acció proapoptòtica. BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> es troben associades al citoesquelet, unides a la cadena lleugera de la dineïna LC8.

### **2. RESULTATS.**

#### **2.1. Anàlisi dels nivells de BIM a les cèl·lules de LLC-B.**

##### **2.1.1. Anàlisi dels nivells basals de BIM a les cèl·lules de LLC-B.**

El primer que vam voler determinar en aquest estudi, van ser els nivells de proteïna de les diferents isoformes d'aquest gen als pacients de LLC-B, per conèixer els nivells d'expressió del gen i si les tres isoformes ho feien per igual. Com es mostra als Western blots de la Figura-11, a les cèl·lules de LLC-B es van trobar presents les tres isoformes de BIM. Tots els pacients estudiats, mostraven nivells elevats de les

isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, mentre que la isoforma BIM<sub>S</sub> presentava uns nivells bastant més baixos. Per aquesta raó, en el nostre estudi ens vam centrar en les isoformes majoritàries, BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, i no vam estudiar la regulació de la isoforma BIM<sub>S</sub>, que semblava ser una forma minoritària en aquest model. Algunes de les diferències observades als nivells de les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> entre pacients, podien ser corregides pels nivells de les proteïnes Bcl-2 o  $\alpha$ -tubulina, que eren semblants entre els diferents pacients, però altres diferències no podien ser corregides (com per exemple si es comparen els pacients 68 i 73, Figura-11). A la majoria de pacients analitzats, semblava que els nivells de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> eren força semblants. També es va estudiar si hi havia correlació entre els nivells de BIM i la viabilitat cel·lular. Com es pot veure a la Figura-11, la viabilitat cel·lular en estat basal i la viabilitat a les 24 hores d'estar en cultiu no eren massa diferents entre pacients, mentre sí que ho eren els nivells de les isoformes de BIM. Per tant no es va trobar cap correlació entre aquests dos paràmetres.

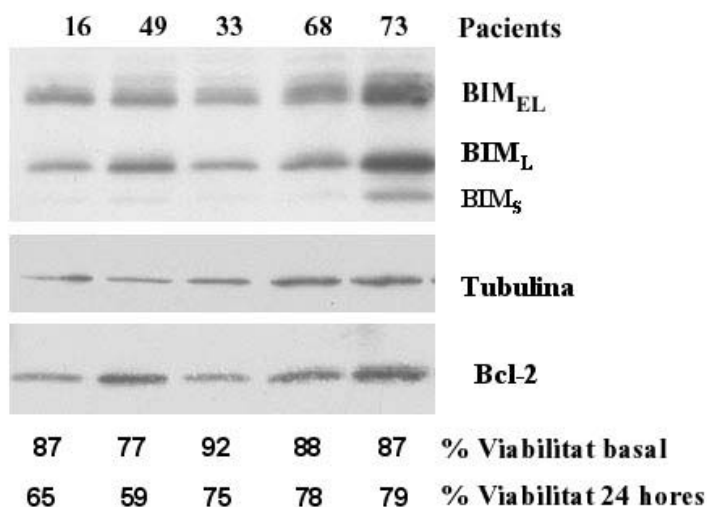


FIGURA-11. Comparació dels nivells basals de BIM entre diferents pacients de LLC-B. Les cèl·lules de 5 pacients de LLC-B representatius ( $3-5 \times 10^6$  cèl·lules/ml ) van ser recollides i processades per analitzar els nivells de les proteïnes d'estudi per Western blot tal i com s'especifica als materials i mètodes. Es van carregar  $10 \mu\text{g}$  de proteïna i es van analitzar els nivells de BIM, i els d' $\alpha$ -tubulina i de Bcl-2 per normalitzar els nivells proteics de BIM entre els diferents pacients. Es mostra també la viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux, en condicions basals i després de 24 hores de mantenir les cèl·lules en cultiu.

### **2.1.2. Anàlisi dels nivells de BIM en cèl·lules tractades amb drogues inductores d'apoptosi.**

Com que BIM és un membre BH3-only proapoptòtic, ens vam preguntar si les diferents drogues utilitzades al laboratori i en la teràpia de la LLC-B afectarien els nivells de BIM. Vam analitzar els efectes sobre BIM dels tractaments amb fludarabina, doxorubicina, dexametasona, clorambucil, acadesina i l'inhibidor de la via PI3K, LY294002. Només la dexametasona, que és un potent glucocorticoid, va induir un clar augment dels nivells de la proteïna BIM. La resta de drogues no semblaven alterar significativament els nivells basals d'aquesta proteïna (dades del grup). Basant-nos en els canvis de proteïna, BIM no sembla ser una peça clau en l'apoptosi induïda per aquestes drogues a les cèl·lules de LLC-B.

## **2.2. Estudi de BIM durant l'apoptosi induïda pel tractament amb glucocorticoids.**

### **2.2.1. Anàlisi per Western blot dels nivells de BIM.**

Ens vam plantejar investigar aquests increments de BIM durant el tractament amb glucocorticoids i determinar si era un gen clau en l'apoptosi induïda per aquests. Es van analitzar els nivells de BIM en cèl·lules de LLC-B tractades amb el glucocorticoid dexametasona durant diferents temps d'incubació. El tractament amb dexametasona-10  $\mu$ M va induir un augment progressiu dels nivells de la isoforma BIM<sub>EL</sub>, que es veia molt clar a les 12 hores i continuava fins a les 24 i 48 hores de tractament, on es detectaven els màxims nivells d'inducció (Figura-12A). La inducció de la isoforma BIM<sub>EL</sub> era paral·lela a la pèrdua de la viabilitat cel·lular deguda al tractament. En canvi, la isoforma BIM<sub>L</sub> pràcticament no es modulava, pel que semblava haver-hi una regulació diferent de les dues isoformes. Els nivells de Bcl-2 no es veien afectats pel tractament amb dexametasona, i ens servien com a control de càrrega.

### **2.2.2. Canvis en l'expressió dels nivells de missatger de *bim*.**

Està descrit que molts dels efectes dels glucocorticoids estan mediat per canvis transcripcionals, amb canvis en els nivells d'RNA missatger. Vam estudiar si el tractament amb glucocorticoids afectava els nivells de missatger de *bim*. Ho vàrem realitzar analitzant els nivells de missatger per la tècnica de la PCR quantitativa a temps real, tot i que presentava algunes limitacions. Amb els *primers* comercials que disposàvem no podíem diferenciar els missatgers corresponents a les diferents

isoformes de *bim*, per tant no podem determinar quina de les isoformes de *bim* s'estava regulant pel tractament amb glucocorticoids. Per altra banda, no esperàvem diferències a nivell transcripcional, ja que la majoria de variants de *bim* són degudes a *splicing* alternatiu, però comparteixen un mateix promotor. El tractament amb dexametasona va induir un clar augment del missatger de *bim*, que es podia veure a les 12 hores, i molt més clarament a les 24 i 48 hores de tractament (Figura-12B). Els increments del missatger eren paral·lels als increments de proteïna, tot i que les induccions de missatger eren molt més accentuades. Per tant, en el model de les cèl·lules de LLC-B, sembla que BIM podria estar jugant un paper clau en l'apoptosi induïda pels glucocorticoids.

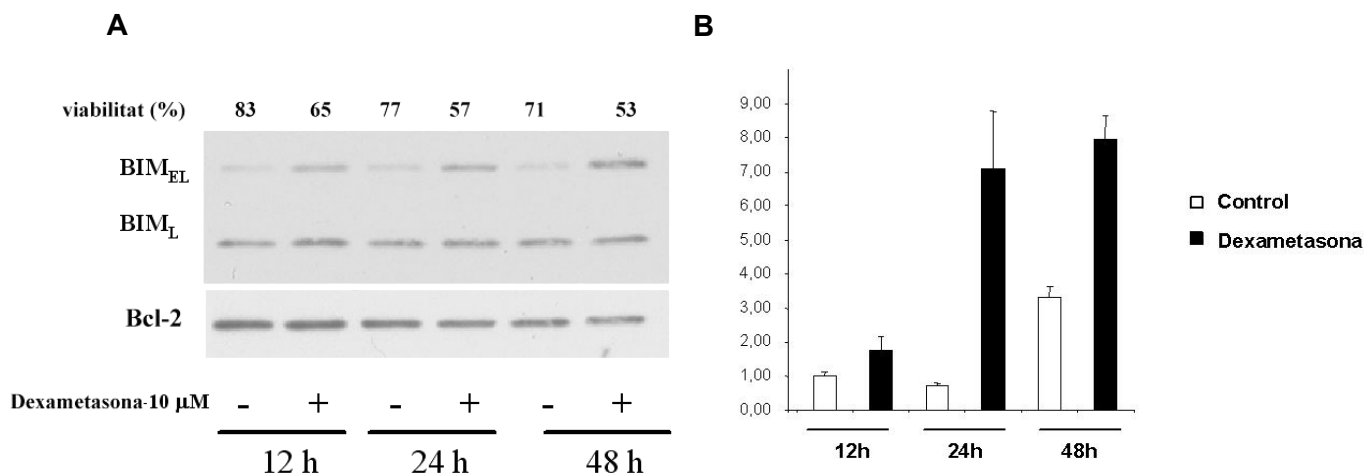


FIGURA-12. Anàlisi de l'expressió dels nivells de BIM durant el tractament amb dexametasona. Es van mantenir les cèl·lules de LLC-B en cultiu ( $16 \times 10^6$  cèl·lules per condició) durant 12, 24 o 48 hores en absència o en presència de dexametasona-10μM. (A) Es van separar  $3 \times 10^6$  cèl·lules, que van ser processades per analitzar els nivells de les proteïnes per Western blot. Es van carregar 10 μg de proteïna i es van analitzar els nivells de BIM i de Bcl-2 amb anticossos específics. (B) La resta de cèl·lules ( $13 \times 10^6$  cèl·lules) van ser processades per obtenir l'RNA total, que va ser retrotranscrit per analitzar per PCR quantitativa a temps real els nivells del missatger de *bim* tal i com s'especifica als materials i mètodes. Es mostra la viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux. Es mostra un experiment representatiu.

### **2.3. Regulació dels nivells de BIM per factors de supervivència de les LLC-B.**

Com s'ha vist anteriorment, un factor inductor d'apoptosi per les cèl·lules de LLC-B, els glucocorticoids, incrementen els nivells de BIM. Partint d'aquest resultat, ens vàrem preguntar si els factors de supervivència descrits per les cèl·lules de LLC-B induïrien la desaparició d'aquesta proteïna proapoptòtica. Al laboratori teníem ben caracteritzada la regulació de la supervivència induïda pels èsters de forbol (TPA) i la interleucina-4 (IL-4) (Bellosillo et al., 1997; Barragán et al., 2002). En els models de supervivència cel·lular, el TPA i la IL-4 activen les vies necessàries per bloquejar l'apoptosi, amb una cinètica d'activació ràpida. També poden revertir l'efecte apoptòtic de diferents drogues d'ús en quimioteràpia, com la dexametasona i la fludarabina, així com també revertir l'apoptosi espontània de les cèl·lules de LLC-B en cultiu cel·lular (Barragán et al., 2002).

#### **2.3.1. Efecte del TPA sobre BIM.**

El TPA és un dels factors inductors de supervivència més potents per les cèl·lules de LLC-B. La concentració de TPA utilitzada és de 10 nM, que és la mínima concentració que presenta el màxim efecte protector. El TPA és capaç d'activar la via de la PKC, que alhora és capaç d'activar altres quinases (Barragán et al., 2002). A la bibliografia estava descrit que les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> eren fosforilades per l'acció del TPA i altres senyals de supervivència en diferents models (Biswas i Greene, 2002; Ley et al., 2003; Luciano et al., 2003).

##### **2.3.1.1. Canvis de BIM induïts per TPA. Fosforilació de BIM.**

Vàrem estudiar si el TPA era capaç d'induir canvis en BIM en les cèl·lules de LLC-B, i quines eren les vies implicades en cas que ho fes. Per aconseguir aquest objectiu, les cèl·lules de LLC-B es van tractar amb TPA-10 nM durant una hora. Al Western blot de les cèl·lules tractades amb TPA s'observaven unes bandes més difoses i amb menys mobilitat electroforètica que substituïen la banda basal de les isoformes majoritàries de BIM (veure Figura-13A, els carrils corresponents al tractament amb TPA). Aquestes bandes corresponien a les isoformes de BIM en diferents estats de fosforilació (Ley et al., 2004). Com a control de l'experiment vam utilitzar novament Bcl-2, que no es modificava i ens servia com a control de càrrega.

Un cop demostrada la capacitat del TPA per fosforilar BIM, vàrem estudiar quines eren les vies implicades en aquesta fosforilació, amb l'ús dels diferents inhibidors de les

vies de transducció del senyal. Les cèl·lules de diferents pacients de LLC-B van ser tractades durant una hora amb els inhibidors de la via PKC, BisI (5  $\mu$ M), de la via PI3K, LY294002 (20  $\mu$ M), o de la via MEK/ERK, U0126 (1  $\mu$ M). Després es van tractar les cèl·lules amb TPA-10 nM durant una hora. Com es pot veure a la Figura-13A, on s'ensenyen dos malalts representatius, els tractaments amb BisI i amb U0126 bloquejaven la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> induïda pel TPA, mentre que el tractament amb LY294002 no tenia cap efecte sobre la fosforilació de BIM. Com a control de l'experiment, es van tractar les cèl·lules amb TPA en presència de l'inhibidor de la transcripció actinomicina-D (1  $\mu$ g/mL), per veure si en la fosforilació de BIM hi estaven implicats també mecanismes de regulació transcripcional. El tractament amb actinomicina-D no va afectar la fosforilació de BIM induïda pel TPA (Figura-13A). Com a control de l'activació de la via d'ERK per TPA i que els inhibidors van funcionar, vam analitzar la fosforilació d'un substrat d'ERK, la MAPK, que es fosforila quan s'activa la via d'ERK. Els tractaments amb BisI i U0126 bloquejaven la fosforilació de la MAPK induïda pel tractament amb TPA, mentre que el LY294002 no tenia cap efecte sobre aquesta (Figura-13A). Tots aquests resultats suggereixen que en les cèl·lules de LLC-B, el TPA induïx l'activació de la via de supervivència de la PKC, que activa la via d'ERK, que seria la quinasa que fosforilaria les isoformes majoritàries de BIM. La via de la PI3K no sembla estar implicada en aquest procés.

Als Western blots es veia que la banda fosforilada de la isoforma BIM<sub>EL</sub> tenia menys intensitat i era més difosa que la banda en condicions basals. Això podia ser degut a que hi haguessin diferents estats de fosforilació, que farien que el senyal es difongués més, o bé que fos degradada via proteasoma. Més endavant analitzarem aquest punt amb més profunditat.

### **2.3.1.2. Efectes del TPA sobre el missatger de BIM.**

Un cop constatat que el TPA induïa la fosforilació de les isoformes majoritàries de BIM, ens vàrem preguntar si durant el tractament es produïen canvis en el missatger de *bim*. Per aconseguir respondre a aquesta pregunta, vàrem tractar les cèl·lules amb TPA sol o combinat amb actinomicina-D durant una hora. Un cop recollides les mostres es van analitzar els nivells de missatger de *bim* per PCR quantitativa a temps real. Com es pot veure a la Figura-13B, el tractament amb TPA no modificava els nivells de missatger de *bim*, mentre que el tractament amb actinomicina-D produïa un descens d'aquests. Aquests resultats demostren que els canvis observats en els



nivells de BIM durant el tractament amb TPA són deguts a la fosforilació i/o degradació de la proteïna i no a la inhibició transcripcional del gen.

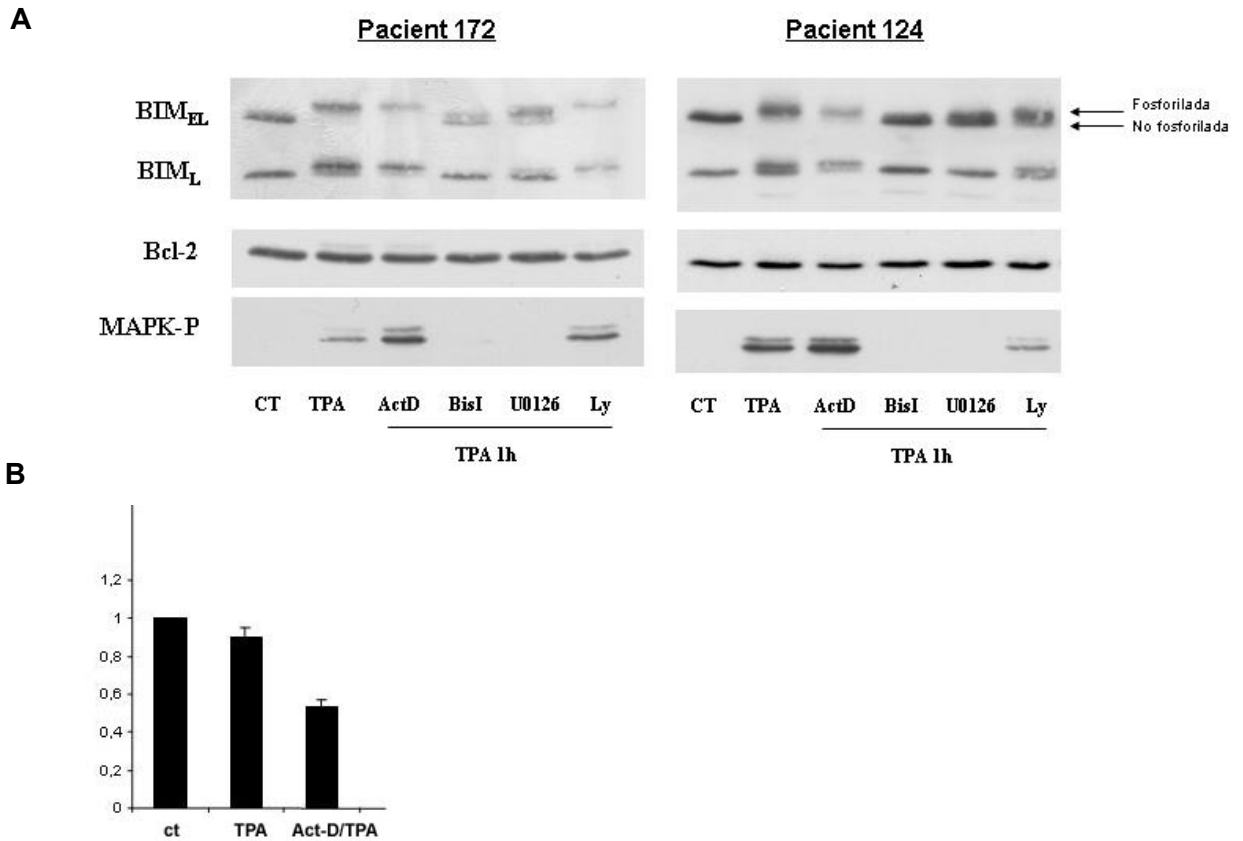


FIGURA-13. Regulació dels nivells de BIM durant el tractament amb TPA i anàlisi de les vies implicades. (A) Es mostren dos pacients representatius, on les cèl·lules ( $3 \times 10^6$  cèl·lules per cada condició) van ser tractades durant una hora amb TPA-10 nM sol o en presència de l'inhibidor general de la transcripció actinomicina-D-1  $\mu\text{g/ml}$  o els diferents inhibidors de les vies de transducció del senyal, BisI-5  $\mu\text{M}$  (inhibidor de la via PKC), LY294002- 20  $\mu\text{M}$ , (inhibidor de la via PI3K) i U0126-1  $\mu\text{M}$  (inhibidor la via d'ERK), preincubats una hora abans d'afegir el TPA. Totes les mostres van ser recollides al mateix temps i processades per analitzar els nivells de les proteïnes BIM, Bcl-2 i MAPK-P (MAPK fosforilada). (B) Quantificació dels canvis als nivells de missatger de *bim* durant el tractament amb TPA. Les cèl·lules ( $14 \times 10^6$  cèl·lules per condició) van ser tractades amb TPA-10 nM sol o en presència de l'inhibidor general de la transcripció actinomicina-D-1  $\mu\text{g/ml}$  preincubat una hora. Es recullen les cèl·lules i es processen per obtenir l'RNA total, que serà retrotranscrit per analitzar per PCR quantitativa a temps real els nivells de missatger de *bim* tal i com s'especifica als materials i mètodes. Les dades són la mitja dels valors de quatre experiments fets independentment.

**2.3.2. Efecte de la IL-4 sobre BIM.**

El fet que el TPA no sigui un factor fisiològic de supervivència per les cèl·lules de LLC-B, ens va fer decidir a caracteritzar l'efecte d'altres factors de supervivència que fossin fisiològics per aquestes cèl·lules, com la interleucina-4 (IL-4). La IL-4 és una de les interleucines més estudiades a les cèl·lules de LLC-B per la seva acció protectora, tant de l'apoptosi espontània com de la induïda per diferents agents quimioterapèutics com els glucocorticoids (Dancescu et al., 1992; Panayiotidis et al., 1993; Bellosillo et al., 1997). Al nostre laboratori, s'ha demostrat que la via per la què la IL-4 induïx supervivència a les cèl·lules de LLC-B és l'activació de la via PI3K/Akt (Barragán et al., 2002).

Les cèl·lules de LLC-B van ser tractades amb IL-4-10 ng/ml, dosi habitualment utilitzada al laboratori, durant diferents temps, que van des dels 15 minuts fins a les 24 hores. Com a control de l'experiment, es van tractar les cèl·lules amb TPA-10 nM durant 15 minuts. El tractament amb IL-4 no va induir la fosforilació ni de BIM<sub>EL</sub> ni de BIM<sub>L</sub>, en cap dels temps assajats, a diferència del tractament amb TPA, que induïa clarament la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> (Figura-14). Novament, la proteïna Bcl-2 no es modulava per cap dels tractaments i ens servia de control de càrrega. Per estar segurs que la IL-4 havia activat les vies de supervivència, vam analitzar la fosforilació d'Akt. La proteïna Akt va ser ràpidament fosforilada en la serina-473, tant per la IL-4 com pel TPA, indicant que les dues drogues han funcionat correctament (Figura-14). Per tant, aquests resultats indiquen que tot i que la IL-4 és un factor inductor de supervivència en les cèl·lules de LLC-B, el seu mecanisme d'acció no està basat en la fosforilació i degradació de BIM.

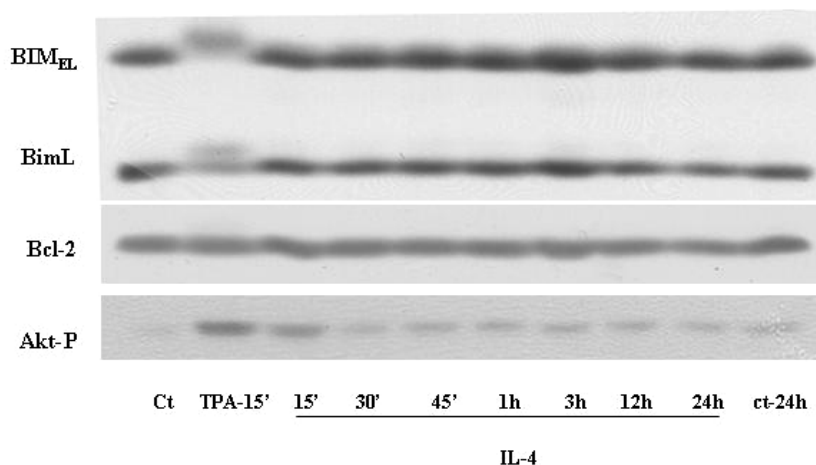


FIGURA-14. Anàlisi de la fosforilació de BIM durant el tractament amb IL-4. Les cèl·lules ( $3 \times 10^6$  cèl·lules per cada condició) van ser tractades amb IL-4 (10 ng/ml) durant diferents temps (15, 30, 45 minuts, 1, 3, 12 i 24 hores), o amb TPA (10 nM) durant 15 minuts com a control de la fosforilació de BIM. Les mostres van ser processades per analitzar els nivells de les proteïnes per Western blot. Es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna i s'analitzen els nivells de BIM, Bcl-2 i Akt-P (fosforilació de la serina-473 d'Akt). La fosforilació d'Akt s'analitza com a control de l'activació de la via PI3K pel tractament amb IL-4. El ct-24 h són cèl·lules que han estat 24 hores en cultiu sense tractar-se. Es presenta un experiment representatiu de dos.

### 2.3.3. Efecte de l'SDF-1 sobre BIM.

El factor derivat de cèl·lules de l'estroma-1 (SDF-1, de *stromal cell-derived factor-1*) és un altre factor de supervivència per les cèl·lules de LLC-B *ex vivo* (Burger et al., 2000). És una citocina involucrada en el desenvolupament de les cèl·lules B, i les cèl·lules de LLC-B tenen receptors per a l'SDF-1 (Burger et al., 1999). L'SDF-1 va ser descrit com un factor de supervivència per les LLC-B amb un perfil d'activació de vies semblant al del TPA, i capaç d'activar a temps molt curts de tractament la via de la MAPK (Burger et al., 2000). Per tot això, aquest era un factor fisiològic que havia de ser investigat, per veure si en el seu mecanisme d'acció era capaç de modular els nivells de BIM.

Com que era un factor que no havíem treballat mai al laboratori, primer de tot vàrem determinar quina era la concentració necessària per activar la via de la MAPK (via MEK/ERK), i si era capaç de fosforilar a BIM. Les cèl·lules de dos pacients de LLC-B es van incubar durant 5 minuts amb diferents dosis d'SDF-1, 25, 50, 100 i 200 ng/ml, i amb TPA-10 nM com a control de la fosforilació de BIM. Totes les concentracions d'SDF-1 testades van ser capaces de fosforilar tant a BIM<sub>EL</sub> com a BIM<sub>L</sub> (Figura-15). A més a més, totes les concentracions analitzades activaven molt bé la via d'ERK, com es pot veure a la fosforilació de la MAPK, així com també eren capaces de fosforilar

l'Akt. El tractament amb TPA, que era el control de l'experiment, era capaç d'induir la fosforilació de la MAPK i Akt en els dos malalts analitzats, així com la fosforilació de BIM. Els nivells de Bcl-2 no es modulaven i ens servien com a control de càrrega. Per tant, aquests resultats indiquen que el factor de supervivència SDF-1, a temps molt curts de tractament, és capaç d'induir la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, i on probablement l'activació de la via d'ERK és necessària per aquesta fosforilació.

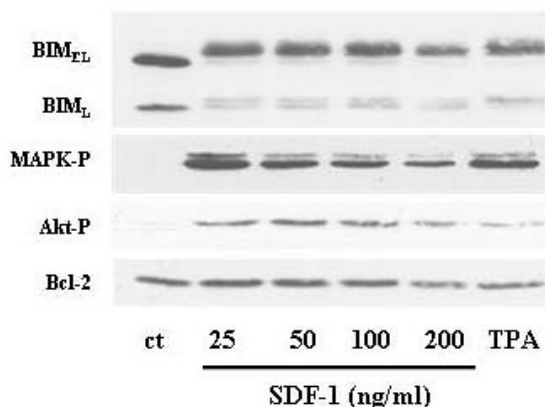


FIGURA-15. Anàlisi de la fosforilació de BIM durant el tractament amb SDF-1. Les cèl·lules de LLC-B ( $3 \times 10^6$  cèl·lules per cada condició) van ser tractades amb SDF-1 a diferents dosis (25, 50, 100 i 200 ng/ml) o amb TPA (10 nM), com a control de la fosforilació de BIM, durant 5 minuts. Les mostres van ser processades per analitzar els nivells de les proteïnes per Western blot. Es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna i s'analitzaren els nivells de BIM, Bcl-2, MAPK-P (fosforilació de la MAPK) i Akt-P (fosforilació de la serina-473 d'Akt). La fosforilació de la MAPK indica l'activació de la via d'ERK i la fosforilació d'Akt indica l'activació de la via d'Akt pel tractament amb les drogues. Es mostra un pacient representatiu de dos.

#### **2.4. Implicació de la via del proteasoma en la regulació dels nivells de BIM.**

Als resultats presentats anteriorment hem vist com dos factors de supervivència per les cèl·lules de LLC-B, TPA i SDF-1, són capaços de fosforilar les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. Hi ha diferents treballs a la literatura on es descriu en diferents models cel·lulars, que la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> induïda per diferents factors de supervivència és el senyal necessari perquè la proteïna sigui degradada per la via del proteasoma (Luciano et al., 2003). Ens vàrem preguntar si en les cèl·lules de LLC-B també es donava aquesta degradació de BIM<sub>EL</sub> via proteasoma.

Primer de tot es va analitzar la implicació de la via del proteasoma en la degradació de BIM<sub>EL</sub> després de la fosforilació induïda per TPA. Les cèl·lules de LLC-B van ser tractades durant diferents temps amb TPA-10 nM sol o combinat amb l'inhibidor del proteasoma MG132-0,5  $\mu$ M preincubat una hora. Al Western blot de la Figura-16, es pot veure com a una hora de tractament amb TPA s'indueïa la fosforilació de les

isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> i a les 3 hores de tractament pràcticament havia desaparegut la isoforma BIM<sub>EL</sub>, mentre que la isoforma BIM<sub>L</sub> no ho feia, d'acord amb els resultats de la bibliografia on es descriu que aquesta isoforma fosforilada no està subjecta a degradació via el proteasoma (comparar les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> en els temps de 3, 4 i 5 hores de tractament amb TPA). En les mostres preincubades una hora amb l'inhibidor del proteasoma abans del tractament amb TPA, clarament es bloqueja la degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> fosforilada, produint-se la seva acumulació (Figura-16). Els nivells de Bcl-2, no estaven afectats pels tractaments, i van ser utilitzats com a control de càrrega. Aquests resultats demostren per primera vegada en cèl·lules de LLC-B, que el TPA indueix la fosforilació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> i la seva degradació per la via del proteasoma.

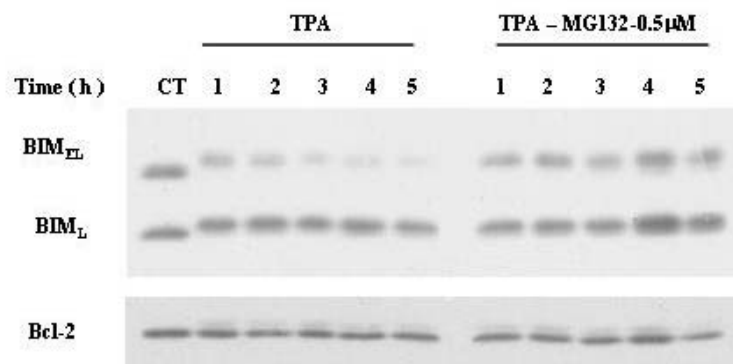


FIGURA-16. Efectes de la inhibició del proteasoma en la regulació dels nivells de BIM<sub>EL</sub> fosforilats. Les cèl·lules de LLC-B ( $3 \times 10^6$  cèl·lules per cada condició) van ser tractades amb TPA-10 nM sol o en la presència de l'inhibidor del proteasoma MG132-0,5  $\mu$ M preincubat una hora, durant 1, 2, 3, 4, o 5 hores. Totes les mostres van ser recollides al mateix temps i processades per analitzar els nivells proteics per Western blot. Es carreguen 15  $\mu$ g de proteïna i s'analitzen els nivells de BIM i de Bcl-2. La viabilitat cel·lular del control (corresponent a la viabilitat basal) i la del tractament amb MG132 més TPA durant 5 hores, és del 84% i 76% respectivament.

Un altre aspecte a investigar van ser els efectes de la inhibició de la via del proteasoma a temps llargs de tractament, per veure si el bloqueig de la degradació de la isoforma de BIM<sub>EL</sub> tenia efectes sobre la viabilitat cel·lular. Es van incubar les cèl·lules d'un pacient de LLC-B amb TPA-10 nM sol o en presència de diferents inhibidors de la via del proteasoma, MG132 (1  $\mu$ M) i LLNL (25  $\mu$ M), preincubats una hora, durant diferents temps. Com s'ha vist anteriorment, a temps curts de tractament, 1, 3 i 5 hores, el TPA induïa la fosforilació i degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub>, i els inhibidors del proteasoma eren capaços de revertir-ho (Figura-17). L'inhibidor MG132 va ser més potent en el seu efecte d'inhibir la via del proteasoma respecte l'LLNL, ja que en els tractaments amb aquest darrer inhibidor hi havia una certa degradació de la

isoforma BIM<sub>EL</sub>, possiblement degut a que la via del proteasoma no estava completament inhibida. Durant els tractaments llargs, de 16 hores, amb els dos inhibidors del proteasoma, pràcticament no es veia ni fosforilació ni degradació dels nivells de BIM<sub>EL</sub>. Això s'entén quan s'analitza la viabilitat cel·lular, on podem veure que la incubació durant temps llargs amb MG132 i LLNL produïa una caiguda dràstica de la viabilitat cel·lular, que fan que aquests punts de proteïna no siguin fiables. Per tant, els tractaments a temps llargs amb els inhibidors de la via del proteasoma (MG132 i LLNL) en les cèl·lules de LLC-B és molt tòxic, pel que la via del proteasoma podria ser important en aquest model per la degradació de substrats específics, entre els que hi podria estar BIM.

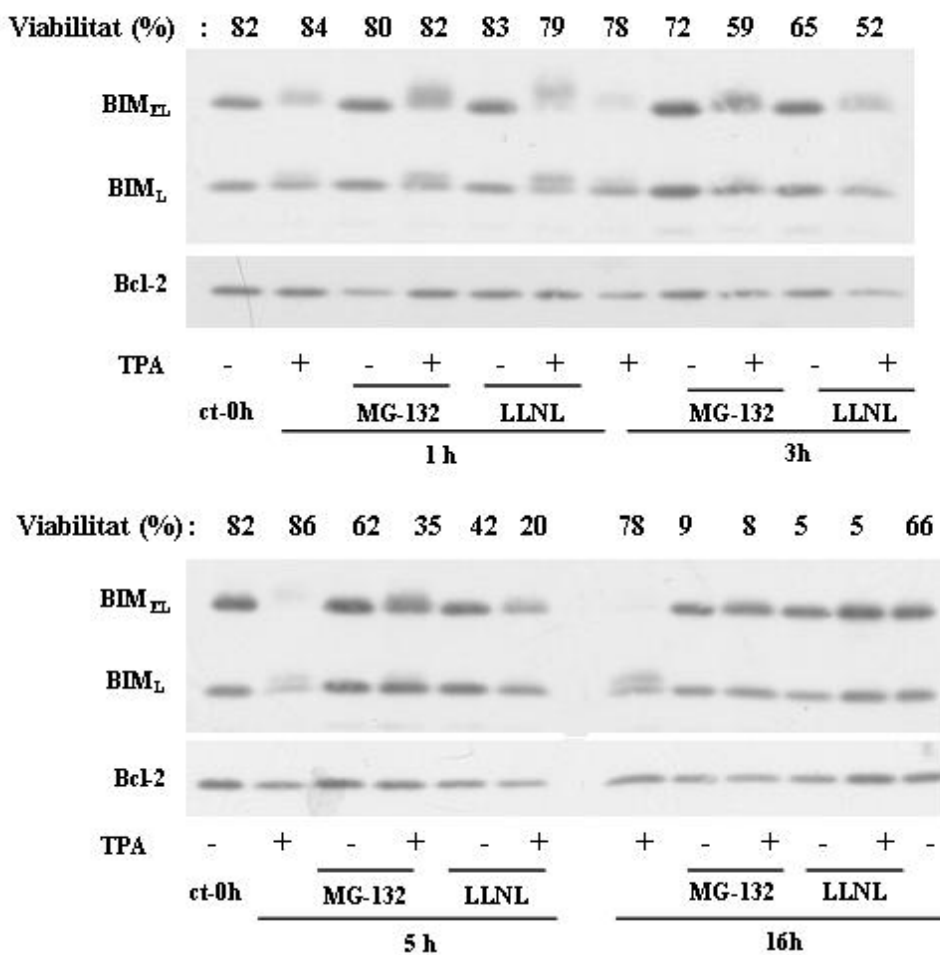


FIGURA-17. Efecte dels inhibidors del proteasoma MG132 i LLNL en els nivells de BIM<sub>EL</sub> fosforilats. Les cèl·lules de LLC-B (3 X 10<sup>6</sup> cèl·lules per cada condició) van ser incubades amb TPA-10 nM sol o en presència d'MG132-1µM o LLNL-25µM, preincubats una hora, durant 1, 3, 5 i 16 hores. Les mostres van ser processades per analitzar els nivells de les proteïnes BIM i Bcl-2 per Western blot. Es carreguen 15 µg de proteïna. La viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux del control (cèl·lules sense tractar) i dels tractaments s'expressa en la part superior de la figura. Es mostra un experiment representatiu.

## **2.5. Anàlisi de la reversió dels efectes dels glucocorticoids pels factors de supervivència que indueixen la fosforilació de BIM.**

Als resultats presentats fins ara, s'ha mostrat com dos factors de supervivència, un de fisiològic com l'SDF-1, i un de no fisiològic com el TPA, són capaços d'induir ràpidament la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. A més, el tractament amb TPA indueix la degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> fosforilada per la via del proteasoma. També hem vist com el tractament amb glucocorticoids indueix transcripcionalment la isoforma BIM<sub>EL</sub> a temps llargs d'incubació.

Resultats previs del nostre grup, indicaven que el TPA era capaç de revertir l'apoptosi induïda pel tractament amb glucocorticoids en les cèl·lules de LLC-B, mentre que no coneixíem quins efectes tenia el factor SDF-1 en l'apoptosi induïda per aquests. Vam decidir investigar l'efecte d'aquests dos factors de supervivència en els nivells de BIM durant l'apoptosi induïda pels glucocorticoids.

### **2.5.1. Efectes del TPA durant el tractament amb glucocorticoids.**

Es van tractar les cèl·lules de LLC-B amb TPA-10 nM o dexametasona-10 µM sols o combinant les dues drogues durant 48 hores, per veure si el TPA era capaç de revertir l'increment dels nivells de BIM<sub>EL</sub> induïts per l'acció dels glucocorticoids. A les 48 hores de tractament amb TPA es produïa una desaparició completa de BIM<sub>EL</sub>, així com també es protegia a les cèl·lules de l'apoptosi espontània, mentre que el tractament amb dexametasona induïa un increment notable dels nivells de BIM<sub>EL</sub> i un fort descens de la viabilitat cel·lular (Figura-18). La isoforma BIM<sub>L</sub> va ser fosforilada durant el tractament amb TPA, i els seus nivells no van ser modificats per cap dels tractaments. Durant el tractament combinat amb dexametasona i TPA, va ser interessant veure com el TPA va tenir un efecte predominant, i va ser capaç de revertir tant el descens de la viabilitat cel·lular com la inducció de BIM<sub>EL</sub> induïda per dexametasona, a més d'induir la seva fosforilació i degradació. Els nivells de Bcl-2 no van ser modulats pels tractaments i van ser utilitzats com a control de càrrega de l'experiment. En el control de 48 hores, que eren cèl·lules que havien estat en cultiu sense haver estat tractades amb dexametasona, es veia un augment de BIM, que correlaciona amb la pèrdua de viabilitat deguda a l'apoptosi espontània. També es van analitzar els nivells d'Mcl-1, que van ser clarament augmentats durant el tractament amb TPA, mentre que l'apoptosi espontània i el tractament amb dexametasona els disminuïa. D'aquests resultats podem concloure que BIM<sub>EL</sub> sembla ser un factor determinant en el mecanisme d'inducció d'apoptosi dels glucocorticoids, així com també podria ser un

punt clau en la reversió de l'apoptosi induïda pel tractament amb TPA, que té un efecte totalment dominant en el tractament combinat amb els glucocorticoides.

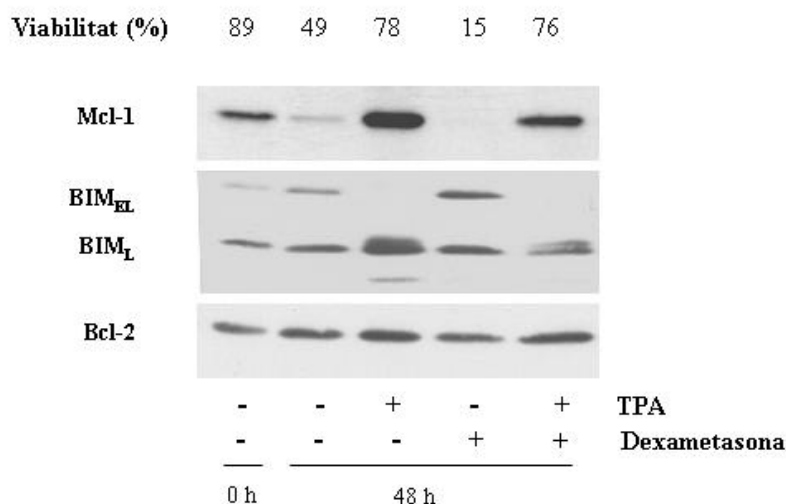


FIGURA-18. Efectes del TPA durant el tractament amb glucocorticoides. Les cèl·lules de LLC-B ( $3 \times 10^6$  cèl·lules per cada condició) van ser tractades amb TPA (10 nM) o dexametasona (10  $\mu$ M) sols o la combinació de les dues drogues (on primer s'afegeix al medi de cultiu la dexametasona i una hora més tard el TPA), durant un període de 48 hores. Es carreguen 10  $\mu$ g de proteïna per analitzar els nivells de BIM, Bcl-2 i Mcl-1 per Western blot. Es mostra la viabilitat cel·lular mesurada per citometria de flux. Es mostra un experiment representatiu de tres.

### 2.5.2. Efectes de l'SDF-1 durant el tractament amb glucocorticoides.

A continuació es van realitzar experiments amb SDF-1 a temps llargs d'incubació, per veure si també era capaç de revertir els efectes d'inducció d'apoptosi i d'increment de BIM<sub>EL</sub> deguts al tractament amb glucocorticoides. Amb un disseny experimental igual al presentat anteriorment, les cèl·lules de LLC-B van ser tractades durant 48 hores amb dexametasona-10  $\mu$ M, SDF-1-50 ng/ml o TPA-10 nM (com a control) sols o combinant cada un dels factors de supervivència amb els glucocorticoides preincubats una hora. Com es veu als Western blots de la Figura-19, el tractament amb SDF-1 a temps llargs d'incubació (48h), no modificava els nivells de fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, a diferència del tractament amb el TPA o amb l'SDF-1 a temps curts (Figura-15). El tractament amb SDF-1 tampoc era capaç de revertir ni la inducció de BIM<sub>EL</sub> ni el descens de la viabilitat induïts pel tractament amb els glucocorticoides, al contrari del que passa amb el TPA (Figura-19). Aquests experiments, tot i que són molt preliminars, semblen



indicar que l'SDF-1, tot i ser un factor de supervivència per les cèl·lules de LLC-B i ser capaç de fosforilar BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub> a temps curts d'incubació, la seva presència en el medi de cultiu no és suficient per revertir els augments de BIM<sub>EL</sub> i l'apoptosi induïts pel tractament amb dexametasona.

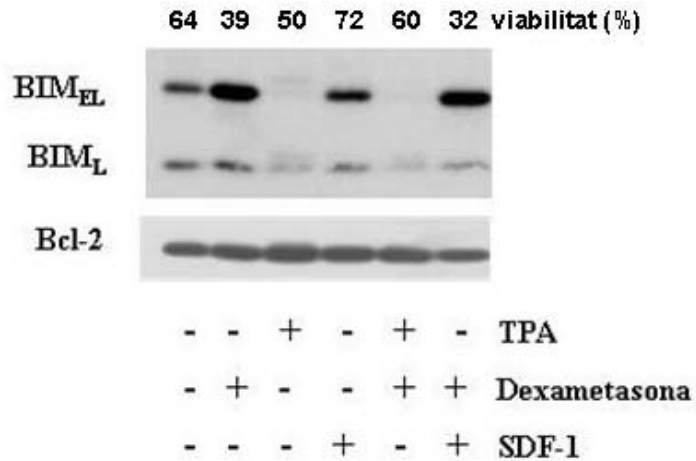


FIGURA-19. Efectes del factor de supervivència SDF-1 durant el tractament amb glucocorticoids. Les cèl·lules de LLC-B van ser tractades amb SDF-1 (50 ng/ml), TPA (10 nM), que ens serveix com a control de l'experiment, o amb dexametasona (10 μM) sols, o la combinació de cada un dels factors de supervivència amb dexametasona preincubada una hora (dexametasona/SDF-1 o dexametasona/TPA), durant un període de 48 hores. Es carreguen 10 μg de proteïna i s'analitzen els nivells de BIM i de Bcl-2 per Western blot. Es mostra la viabilitat cel·lular mesurada per l'exposició de fosfatidilserina i captació de iodur de propidi. Es mostra un experiment representatiu de tres.

## **DISCUSSIÓ DELS RESULTATS.**

Fins el moment de la redacció d'aquesta discussió, no hi ha cap estudi de la regulació de la proteïna proapoptòtica BIM a les cèl·lules de LLC-B. Als darrers anys, s'han realitzats molts estudis de la regulació i funció de BIM a diferents models cel·lulars, on aquest gen ha pres una gran importància en la regulació del procés apoptòtic. A la bibliografia hi ha molts pocs treballs on es mostrin resultats de BIM en cèl·lules de LLC-B (Morales et al., 2004; Marzo et al., 2004). Per tant el nostre estudi és pioner en la descripció de la regulació de BIM en les cèl·lules de LLC-B, durant l'apoptosi induïda per glucocorticoids i durant el tractament de les cèl·lules amb factors de supervivència, així com els mecanismes i vies implicades en aquesta modulació.

## **ANÀLISI DELS NIVELLS DE BIM EN PACIENTS DE LLC-B.**

L'anàlisi dels nivells de BIM en pacients de LLC-B, ha revelat que hi ha diferències d'expressió entre pacients, i que en les cèl·lules de LLC-B hi ha dues isoformes majoritàriament expressades, que són BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. Si al Western blot es carreguen més de 20 µg de proteïna, a tots els pacients analitzats també es detecta la isoforma BIM<sub>S</sub>; tot i detectar-se, com que no sembla ser una forma majoritària no l'hem tinguda en compte en el nostre estudi, per tal de simplificar-lo. A més, està descrit que té una regulació diferent a les altres dues isoformes (Adachi et al., 2005). No hem trobat correlació entre els nivells de BIM i la viabilitat de les cèl·lules en estat basal que han estat en cultiu 24 hores.

## **INDUCCIÓ DE BIM PER GLUCOCORTICOIDS.**

En cèl·lules d'origen limfoide s'ha descrit que el tractament amb dexametasona indueix les tres isoformes proteïques de BIM a les 6 hores de tractament, quan les cèl·lules comencen a entrar en apoptosi, arribant al punt màxim d'inducció a les 24 hores, requerint de l'activació transcripcional del gen. Només s'indueixen els nivells de BIM a concentracions de dexametasona suficients per induir apoptosi, i on sembla que la inducció de BIM és anterior a l'inici del procés d'apoptosi (Wang et al., 2003). Els resultats presentats al nostre estudi mostren que durant el tractament amb dexametasona, un potent glucocorticoid, hi ha una clara inducció de la isoforma BIM<sub>EL</sub>. Els augments de la proteïna BIM<sub>EL</sub> ja es veuen a les 12 hores de tractament, i són molt més evidents a temps llargs d'incubació amb dexametasona (Figura-12A). Tot i això, a les cèl·lules de LLC-B, el tractament amb dexametasona no és capaç de modular els

nivells de la isoforma BIM<sub>L</sub>, en desacord amb la majoria de treballs de la literatura, on es descriu la inducció de les tres isoformes majoritàries de BIM per glucocorticoids en diferents models cel·lulars (Wang et al., 2003; Abrams et al., 2004; Zhang i Insel, 2004).

Molts dels canvis en els nivells de BIM són deguts a la regulació transcripcional del gen (Dijkers et al., 2002). Els nostres resultats demostren que hi ha una inducció a nivell transcripcional del missatger de *bim* durant el tractament amb glucocorticoids. Els augments del missatger es veuen aviat, a les 12 hores de tractament, i molt més clarament als temps llargs, a les 24 i 48 hores, on s'arriba a la inducció màxima (Figura-12B). Aquests augments del missatger de *bim* induïts pel tractament amb dexametasona, són paral·lels als augments vistos a nivell de proteïna, tot i que les induccions del missatger són molt més accentuades. Per tant, en el model de les cèl·lules de LLC-B, sembla que BIM podria estar jugant un paper clau en l'apoptosi induïda pels glucocorticoids. Tot i que BIM sembla estar clarament implicat en la mort induïda pel tractament amb glucocorticoids, el seu mecanisme de regulació no està clar. El promotor del gen *bim* humà no conté cap element de resposta a glucocorticoids, i el tractament amb cicloheximida bloqueja la inducció de *bim* per aquests. Per tant, la inducció de *bim* durant el tractament amb dexametasona no és directe mitjançant el receptor de glucocorticoids (Wang et al., 2003). Tot i la importància de BIM en la inducció de l'apoptosi per glucocorticoids, les cèl·lules T immadures del ratolí *Knock-out* per *bim* no són completament resistents a l'apoptosi induïda per aquests. Aquestes cèl·lules, tot i no presentar una resistència completa, moren amb una cinètica molt més retardada durant el tractament amb dexametasona (Bouillet et al., 1999). La resistència incompleta de les cèl·lules *bim*<sup>-/-</sup> al tractament amb dexametasona suggereix que algun altre membre BH3-only podria estar compensant l'absència de BIM. S'ha suggerit que PUMA podria ser aquest membre que compensa l'absència de BIM i desencadena la mort durant el tractament amb glucocorticoids, ja que s'ha vist que el missatger de *puma* també augmenta durant el tractament amb dexametasona (Han et al., 2001).

També hem vist un increment de BIM a les cèl·lules que estan en cultiu 48 hores sense haver estat tractades amb dexametasona (que són el control de 48 hores, Figura-18); aquesta inducció correlaciona amb la pèrdua de la viabilitat cel·lular deguda a l'apoptosi espontània. A diferència dels nostres resultats, a la literatura s'ha descrit que els nivells del missatger de *bim* són disminuïts en cèl·lules de LLC-B durant l'apoptosi espontània o durant la privació de sèrum. Després de la retirada de sèrum

es dona un augment dels nivells de missatger de *bim* a moltes línies cel·lulars, tot i que els nivells són disminuïts a cèl·lules de LLC-B i cèl·lules B normals, així com també a les línies cel·lulars d'origen limfoide-B (Morales et al., 2004).

Recentment s'ha publicat un treball on es descriu que la resistència d'alguns pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda al tractament amb dexametasona, és deguda a que no són capaços d'induir BIM, sense estar alterada ni la quantitat de receptor de glucocorticoids ni la capacitat d'unió del lligant al receptor (Bachmann et al., 2004). En el nostre estudi hem trobat dos pacients de LLC-B que són resistents al tractament amb dexametasona. Malauradament, hem disposat de molt poques cèl·lules d'aquests pacients, per això només hem pogut fer un número limitat d'experiments. Tot i que les dades són molt preliminars, sembla que hi ha una certa inducció dels nivells de BIM per dexametasona, tot i que no s'indueix apoptosi.

#### **ANÀLISI DE LA FOSFORILACIÓ DE BIM PELS FACTORS DE SUPERVIVÈNCIA.**

Al nostre estudi hem descrit com dos factors de supervivència per les cèl·lules de LLC-B, el factor fisiològic SDF-1 i el TPA, són capaços de fosforilar les isoformes de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. La fosforilació de les isoformes de BIM es veu als 5 minuts de tractament, i als Western blots es pot veure la desaparició de la banda basal de les dues isoformes i l'aparició de bandes més difoses i amb menys mobilitat electroforètica, que corresponen a les proteïnes en diferents estats de fosforilació (figures 13A i 15). A la bibliografia està àmpliament descrita la fosforilació d'aquestes dues isoformes de BIM. Les tres isoformes majoritàries de BIM és sintetitzen a partir del mateix transcrit, i s'expressen a diferents nivells a les cèl·lules, essent BIM<sub>EL</sub> la majoritària. Tant BIM<sub>L</sub> com BIM<sub>S</sub> perden la regió entre els aminoàcids 43 i 101 respecte BIM<sub>EL</sub>, i són dèbilment fosforilades per certs estímuls, indicant la importància d'aquesta regió en la fosforilació de BIM<sub>EL</sub>. En aquesta regió s'han identificat potencials dianes de fosforilació per PKC i PKA. En diferents models, la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> per TPA només és parcialment inhibida per l'inhibidor de MEK1, U0126. Això suggereix que pot haver-hi una fosforilació de BIM<sub>EL</sub> dependent de PKC, que tindria lloc sense l'activació d'ERK, al residu de la Ser-69 (Luciano et al., 2003; Ley et al., 2004). Els resultats presentats demostren com l'inhibidor de la PKC, BisI, és capaç de revertir completament la fosforilació de les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. Per altra banda, l'inhibidor de MEK, U0126, tot i ser capaç de revertir, almenys parcialment, la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> per TPA, sembla ser menys eficaç, detectant-se bandes amb una menor mobilitat electroforètica per damunt de la banda basal. La fosforilació de la isoforma

BIM<sub>EL</sub> en la Ser-109 i Thr-110, dependent de la via de MEK/MAPK, suprimeix l'acció proapoptòtica de BIM<sub>EL</sub> sense afectar la unió de la proteïna a la cadena lleugera de la dineïna, ni la seva localització subcel·lular (Biswas i Greene, 2002). En diferents models cel·lulars s'ha descrit la via d'ERK com la principal via de fosforilació de BIM<sub>EL</sub> (Weston et al., 2003; Mouhamad et al., 2004). Hem vist com l'SDF-1 i el TPA indueixen l'activació de la via d'ERK/MAPK a temps molt curts de tractament, suggerint que aquesta via podria ser la responsable de fosforilar les isoformes majoritàries de BIM a les cèl·lules de LLC-B, tot i que la via de la PKC també podria estar-hi implicada.

També vam analitzar l'efecte sobre la fosforilació de BIM d'un altre factor fisiològic inductor de supervivència per les cèl·lules de LLC-B, la IL-4 (interleucina-4). Aquest factor és capaç d'activar la via de la PI3K, que fosforilaria i activaria la PKB/Akt, induint la supervivència de les cèl·lules de LLC-B (Barragán, 2002). La incubació d'aquesta interleucina a concentracions on s'activa l'Akt i on es reverteix l'apoptosi espontània i l'apoptosi induïda per diferents drogues quimioterapèutiques, no produeix la fosforilació de cap de les isoformes de BIM (Figura-14). Tot i això, s'ha descrit l'efecte protector de la IL-4 en l'apoptosi induïda pels glucocorticoids (Dancescu et al., 1992; Panayiotidis et al., 1993; Bellosillo et al., 1997). Per tant, tot i que la IL-4 és un factor inductor de supervivència en les cèl·lules de LLC-B, i és capaç de revertir els efectes dels glucocorticoids, el seu mecanisme d'acció no es basa en la fosforilació i degradació de BIM, que sembla ser una de les principals dianes d'acció d'aquests potents inductors de mort pels limfòcits B. Tot i que la via de la PI3K no sembla estar implicada a la fosforilació de BIM per TPA, aquesta via ha estat implicada a la regulació de BIM a altres nivells en diferents models cel·lulars (Kuribara et al., 2004). A la literatura està descrit que el LY294002, inhibidor de la PI3K, incrementa els nivells de missatger de *bim* 25 vegades, que va seguit d'augmentos de la proteïna (Ley et al., 2003). Els augmentos de BIM pel tractament amb LY294002 es deuen al bloqueig de l'activació de la quinasa PKB/Akt, que faria que es desfosforilés el factor de transcripció FKHR-L1 (o FoxO3), activant-se, que seria capaç d'induir el missatger de *bim* (Dijkers et al., 2002; Stahl et al., 2002; Gilley et al., 2003; Rosas et al., 2005). Tot i que els nostres resultats són molt preliminars, les dades obtingudes no semblen indicar que l'inhibidor LY294002 indueixi increments dels nivells de missatger i proteïna de BIM. Per tant sembla ser que els factors de transcripció de la família Forkhead no estarien implicats en la regulació de BIM a les cèl·lules de LLC-B.

**FOSFORILACIÓ DE BIM PER TPA I DEGRADACIÓ PER LA VIA DEL PROTEASOMA.**

Hem estudiat les vies de transducció del senyal implicades en la fosforilació de les isoformes majoritàries de BIM durant el tractament d'una hora amb TPA. La inhibició de la via de la PKC i de l'ERK/MAPK (amb els inhibidors BisI i U0126 respectivament), bloqueja la fosforilació de les isoformes de BIM per TPA, mentre que la inhibició de la via PI3K (amb l'inhibidor LY294002) no té cap efecte en la fosforilació de BIM induïda per TPA (Figura-13A). A la bibliografia està descrit, en diferents models, la implicació de la via d'ERK/MAPK en la fosforilació de les isoformes de BIM, on el tractament amb U0126 i PD980559, dos inhibidors de la via, evitaria la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i la seva degradació pel proteasoma. El tractament amb MG132 no afecta la fosforilació de BIM<sub>EL</sub>, però evita la desaparició d'aquesta (Mouhamad et al., 2004). A la línia cel·lular Jurkat l'estimulació amb TPA induïx l'activació de la via d'ERK1/2 i és detecta la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> als 5 minuts de tractament, que és inhibida per U0126 (Luciano et al., 2003). Els nostres resultats semblen indicar que en les cèl·lules de LLC-B, el TPA induiria l'activació de la via de supervivència de la PKC, que activaria la via d'ERK. L'activació de les dues vies fosforilarien les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, mentre que la via de la PI3K no estaria implicada en aquest procés.

Un dels resultats que hem descrit més clarament i per primera vegada en cèl·lules de cultius primaris de LLC-B, és la implicació de la via del proteasoma en la degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> fosforilada. A la bibliografia està àmpliament descrita la degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> per la via del proteasoma en diferents models cel·lulars, on està implicada la via de MEK/MAPK (Akiyama et al., 2003; Ley et al., 2003; 2004). El tractament amb TPA induïx la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> a la serina-69, que només està present en BIM<sub>EL</sub>, i no es troba ni en BIM<sub>L</sub> ni BIM<sub>S</sub>. Aquesta fosforilació és mediada per la quinasa ERK1/2, i és el senyal perquè sigui degradada pel proteasoma (Luciano et al., 2003). Per tant, BIM<sub>EL</sub> és l'única isoforma que es degradada pel proteasoma. La preincubació de les cèl·lules de LLC-B amb els dos inhibidors del proteasoma que hem provat, MG132 i LLNL, abans del tractament amb TPA, no afecten la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, però sí són capaços d'evitar la desaparició de la isoforma BIM<sub>EL</sub> fosforilada, indicant la necessitat de la via del proteasoma per la degradació d'aquesta. Els dos inhibidors del proteasoma a temps llargs d'incubació són molt tòxics, ja que la via del proteasoma és important pel recanvi de proteïnes, algunes implicades en supervivència, o per degradar proteïnes mal plegades, i això fa que la inhibició d'aquesta via induïxi apoptosi. També hem mostrat, que no hi ha

inhibició transcripcional durant la desaparició de BIM<sub>EL</sub> induïda pel tractament amb TPA. Per tant, la desaparició de les formes fosforilades es deu únicament a la seva degradació via proteasoma.

## REVERSIÓ DELS EFECTES DELS GLUCOCORTICOIDES PER TPA.

Hem descrit com el TPA és capaç de revertir els efectes dels glucocorticoides a temps llargs de tractament. Aquests dos factors tenen accions contràries en la regulació dels nivells de BIM. Mentre el tractament amb dexametasona indueix increments del missatger i de la proteïna de BIM, on aquest sembla ser un factor determinant en el mecanisme d'inducció d'apoptosi. De manera contrària el tractament a temps llargs amb TPA indueix la fosforilació i degradació de BIM<sub>EL</sub>, afavorint la desaparició d'una molècula proapoptòtica, que podria ser una de les causes de la inducció de supervivència per aquest factor. Durant el tractament combinat amb dexametasona i TPA, el segon té un efecte dominant sobre l'efecte dels glucocorticoides, produint-se el mateix efecte que amb el tractament amb TPA sol (Figura-18). Aquest efecte predominant del TPA sobre la dexametasona també es veu en Mcl-1. La proteïna Mcl-1 és disminuïda pel tractament amb dexametasona i és augmentada durant el tractament amb TPA, i durant el tractament combinat d'ambdós factors l'augment és menor. Per tant en les cèl·lules de LLC-B, el tractament amb TPA és capaç de revertir els efectes apoptòtics dels glucocorticoides.

L'estudi per veure si el factor SDF-1 també era capaç de revertir els efectes dels glucocorticoides, ha mostrat que aquest factor, tot i ser capaç d'induir ràpidament l'activació de la via de MAPK i la fosforilació de la isoforma BIM<sub>EL</sub>, sembla perdre tot el seu efecte a temps llargs d'incubació. L'SDF-1 no és capaç de revertir ni l'increment dels nivells de BIM ni la pèrdua de la viabilitat cel·lular induïda pels glucocorticoides, així com tampoc és capaç de mantenir a la isoforma BIM<sub>EL</sub> fosforilada a temps llargs d'incubació. Per tant, el tractament combinat de dexametasona i SDF-1 té el mateix efecte que el tractament amb glucocorticoides sols. Així doncs hi ha una gran diferència en els efectes del TPA i l'SDF-1. El tractament amb TPA produeix la fosforilació de les isoformes de BIM en tots els temps assajats, des dels 5 minuts fins a les 48 hores d'incubació. Segurament això es deu a que el TPA és un compost liposoluble que s'intercala en les membranes plasmàtiques, activant ràpidament i de forma permanent la via de la PKC. A les cèl·lules tractades amb TPA, l'activació permanent de la via de la PKC podria fer que s'activés també de forma permanent la via de MEK/MAPK, que

seria la responsable que durant tot el temps de tractament es produeixi la fosforilació de les isoformes de BIM. A diferència del TPA, sembla que el tractament amb el factor SDF-1 produiria la fosforilació de les isoformes de BIM només a temps curts de tractament. Quan es fan incubacions de 48 hores amb aquest factor no es pot veure la fosforilació de BIM, tot i que en mostres de les mateixes cèl·lules tractades amb SDF-1, recollides a 5 minuts de tractament, es veu clarament la fosforilació de BIM i l'activació de la MAPK. A la bibliografia està descrit, a la línia cel·lular Ramos, que la incubació amb anti-IgM indueix una ràpida fosforilació de BIM<sub>EL</sub>, que es detecta als 30 segons, i és màxima entre 15 i 60 minuts. La fosforilació de BIM<sub>EL</sub> és paral·lela a la fosforilació d'ERK1/2. A les 6 hores de tractament disminueixen les formes fosforilades de BIM<sub>EL</sub>, i es detecta un augment progressiu, fins a les 24 hores, dels nivells de BIM<sub>EL</sub> no fosforilats deguts a nova síntesi de proteïna, que correlacionen amb la inducció d'apoptosi i amb el processament de la PARP (Luciano et al., 2003). L'efecte de l'SDF-1 en la fosforilació de BIM podria tenir efectes semblants als anteriorment descrits. Els resultats obtinguts amb l'SDF-1 seran estudiats amb més profunditat en el futur, per tal d'entendre quin és el mecanisme d'acció de l'SDF-1 i les diferències entre l'acció d'aquest *in vivo* i *ex vivo* en les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica.

A la bibliografia està descrit que en els estadis inicials d'apoptosi les formes de BIM<sub>EL</sub> fosforilades que estan lliures al citosol poden ser processades per les caspases, generant un fragment molt més potent en la inducció de l'apoptosi, amplificant així el procés de mort (Chen i Zhou, 2004). Nosaltres no hem analitzat la implicació de les caspases sobre les diferents isoformes de BIM en l'apoptosi induïda per glucocorticoids, ja que en la inducció de mort per dexametasona, es produeix un increment dels nivells de BIM<sub>EL</sub>, però en cap cas hem vist l'aparició de bandes de menor mida que poguessin correspondre a aquestes formes processades per caspases, o bandes de major mida que corresponguessin a bandes fosforilades.

En cèl·lules de pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda, la inducció de BIM<sub>EL</sub>, BIM<sub>L</sub>, i BIM<sub>S</sub>, correlaciona amb la sensibilitat dels pacients al tractament amb glucocorticoids. La reducció dels nivells de BIM per RNAi (de *RNA interference*) augmenta la resistència de les cèl·lules al tractament amb glucocorticoids. El nivell de resistència és proporcional a la potència de silenciament de les diferents isoformes de BIM. Si s'inhibeix BIM<sub>EL</sub> sol o BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>, però no BIM<sub>S</sub>, les cèl·lules presenten menys resistència al tractament amb glucocorticoids respecte a les cèl·lules on s'han inhibit les tres isoformes. Per tant, sembla que la inducció de les tres isoformes contribueix a la mort per glucocorticoids (Abrams et al., 2004). Sembla clar que les diferents



isoformes de BIM són les responsables de l'apoptosi induïda pel tractament amb glucocorticoids. Això cal tenir-ho en compte en pacients que no són capaços d'induir BIM durant el tractament amb glucocorticoids *ex vivo*, ja que segurament seran refractaris al tractament. La desaparició de BIM<sub>EL</sub> induïda per TPA pot ser un dels mecanismes pels què aquest factor bloqueja la mort de les cèl·lules de LLC-B induïda pel tractament amb dexametasona. Calen més estudis per descobrir quin és el mecanisme pel qual augmenten els nivells de BIM durant el tractament amb glucocorticoids, i la possible regulació d'aquests, per aconseguir una teràpia més efectiva en el tractament de diferents tipus de leucèmia.



---

**CONCLUSIONS**



**CONCLUSIONS.**

**Els resultats de l'estudi de la regulació transcripcional i traduccional d'Mcl-1 en l'apoptosi induïda per aspirina i estaurosporina a la línia cel·lular Jurkat ens permeten concloure el següent:**

Els nivells proteics d'Mcl-1 disminueixen ràpidament després de diferents estímuls apoptòtics, i de manera paral·lela a la pèrdua de la viabilitat cel·lular. En aquest descens hi estan implicades tant vies dependents com independents de l'activació de les caspases. La proteïna Mcl-1 és degradada, almenys en part, per la via del proteasoma.

L'estaurosporina inhibeix la transcripció d'*mcl-1* de manera dependent de l'activació de les caspases, i té altres efectes a nivell post-transcripcional caspasa-independents. L'aspirina inhibeix la síntesi proteica sense afectar la transcripció del gen. Per tant la inhibició transcripcional no és un fenomen que necessàriament tingui lloc durant l'apoptosi.

La inhibició de la síntesi proteica per aspirina a les cèl·lules Jurkat té lloc, almenys en part, per la inducció de la fosforilació del factor eIF2 $\alpha$ . L'aspirina produeix un pic transitori de fosforilació d'eIF2 $\alpha$  al poc d'iniciar-se el tractament, quan encara no s'han activat les caspases. L'aspirina fa disminuir els nivells de proteïnes amb vida mitja curta.

La desaparició d'Mcl-1 pot ser necessària, però no suficient, per disparar l'apoptosi induïda per aspirina i estaurosporina a les cèl·lules Jurkat, on Mcl-1 podria actuar com un sensor cel·lular de la inhibició de la síntesi proteica.

**Els resultats de l'anàlisi de les insercions al promotor d'*mcl-1* en les cèl·lules de LLC-B ens permeten concloure el següent:**

Les insercions descrites al promotor del gen *mcl-1*, en realitat són un polimorfisme present a tota la població, i no només a la població leucèmica.

**Els resultats de l'estudi de la regulació de BIM en les cèl·lules de LLC-B ens permeten concloure el següent:**

Els pacients de LLC-B presenten diferents nivells de BIM, on majoritàriament predominen les isoformes BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. No s'ha trobat correlació entre la viabilitat basal i els nivells d'expressió de les isoformes de BIM.

Els glucocorticoids augmenten els nivells de missatger de BIM i de la isoforma proteica BIM<sub>EL</sub>, que podria estar jugant un paper clau en l'apoptosi.

Dos factors de supervivència per les cèl·lules de LLC-B, un de fisiològic com l'SDF-1, i un de no fisiològic com el TPA, són capaços d'induir ràpidament la fosforilació de BIM<sub>EL</sub> i BIM<sub>L</sub>. Almenys el TPA, és capaç d'induir la posterior degradació de la isoforma BIM<sub>EL</sub> per la via del proteasoma. El TPA indueix l'activació de la via de supervivència de la PKC, que activa la via d'ERK, que seria la quinasa que fosforilaria les isoformes majoritàries de BIM. La via de la PI3K no sembla estar implicada en aquest procés.

El TPA, però no l'SDF-1, és capaç de revertir la inducció dels nivells de BIM i el descens de la viabilitat cel·lular induïda pel tractament amb dexametasona. BIM podria ser un punt clau en la reversió de l'apoptosi induïda pel tractament amb TPA, que té un efecte totalment dominant en el tractament combinat amb els glucocorticoids.