



**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

**Estudi de la rellevància dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en la resistència a la mort induïda per la via extrínseca a través dels lligands de mort**

Tesi doctoral

Elisenda Casanelles Abella

Bellaterra, 16 juliol de 2013





**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

**Estudi de la rellevància dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en la resistència a la mort induïda per la via extrínseca a través dels lligands de mort**

Memòria de la Tesi Doctoral presentada per **Elisenda Casanelles Abella** per optar al **Grau de Doctor en Neurociències** per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat en la *Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona*, sota la direcció dels Drs. Víctor J. Yuste Mateos, Joan X. Comella Carnicé i Stéphanie Reix.

Amb el suport econòmic del *Ministerio de Ciencia e Innovación* (Beca FPU) i de l'*Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya*.

Doctoranda,

Elisenda Casanelles Abella

Directors de Tesi,

Dr. Víctor J. Yuste Mateos

Dr. Joan X. Comella Carnicé

Dra. Stéphanie Reix

Bellaterra, 3 de juny de 2013

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to one of the thesis directors, written over a horizontal line.



*Per a tu*



**The only real voyage of discovery consists  
not in seeking new landscapes,  
but in having new eyes.**

**Marcel Proust**





# Agraïments

Després de tants i tants dies escrivint, corregint i modificant els diferents apartats científics d'aquesta tesi, ha arribat el moment d'escriure la que serà la part més llegida de la tesi i que a més ningú ha de corregir! Els agraïments són molt importants per que una tesi costa, i molt. I durant els anys de tesi, hi ha hagut moments on m'he sentit molt "petita" i veia molt lluny acabar-la i, si finalment ho he aconseguit, és en gran part, a totes les persones, que no són poques, que m'han ajudat a fer aquest camí.

En primer lloc, vull agrair als meus directors de tesi Joan X. Comella, Stéphanie Reix i Víctor J. Yuste, per haver-me donat aquesta oportunitat i haver confiat en mi. Entre els tres m'heu donat les eines perquè aquest treball hagi estat possible i per continuar endavant un cop acabada aquesta etapa.

A tu Joan et vull agrair que em truquessis personalment per a fer l'entrevista, que decidissis apostar per mi i permetre incorporar-me al teu grup, totes les coses que he pogut aprendre de tu, la teva comprensió en determinats moments i les facilitats que m'has donat perquè aquesta tesi hagi estat possible.

A ti Stéph te agradezco todo el tiempo que me dedicaste al principio de la tesis, enseñándome técnicas, hablando de experimentos, guiándome y resolviendo las dudas que se me presentaban.

A tu Víctor t'agraeixo, en general, tota la teva ajuda: la del principi, quan em vas dir que creies que era capaç de fer una bona tesi i vas decidir apostar pel mi. La del mig, per ensenyar-me a treballar i a posar tots els controls, a optimitzar protocols, xivar-me molts "truquets" de laboratori i, sobretot, t'agraeixo la teva capacitat per animar, perquè sempre que t'he ensenyat un resultat que no entenia o no veia clar, m'has dedicat un temps per ensenyar-me a veure'l amb uns altres ulls i sempre en positiu, perquè "les coses no són màgiques!". I per acabar, t'agraeixo molt la teva ajuda del final: per haver-me donat temps per escriure, per la teva implicació en les correccions i per haver-me dedicat un munt d'hores (treballant i fent una mica el pallaso). Realment (coma) crec que seria difícil (coma) si no impossible (coma) trobar un altre director "cóm" tu!!!

També voldria agrair el suport econòmic del Ministerio de Ciencia e Innovación que em va concedir una beca FPU per a finançar-me la realització d'aquesta tesi.

Gràcies també als membres de la meva comissió de seguiment, pel temps dedicat en supervisar el meu treball.

Membres del tribunal, Joan, Dolors i Miguel, moltes gràcies per acceptar formar part del tribunal avaluador de la meva tesi i per respondre tots els mails tant ràpidament! Jose i Judit, moltes gràcies per acceptar estar disposats a entrar en acció!

Vull agrair a les noies amb qui he compartit grup: a l'Estel, la Victoria, la Mertx i a la Maria, perquè juntes hem viscut mooooooolts moments i amb vosaltres he après moltes coses i he madurat molt durant aquests anys. Moltes gràcies per la vostra ajuda en tants moments al lab, per les vostres idees als lab meetings, per les converses i perquè cadascuna de nosaltres te "lo seu", però juntes hem fet un puzzle que encaixava! (Maria i Mertx, no m'hauria imaginat que el dia abans del dipòsit de la tesi aterraríem després de passar 6 dies de congrés... ha sigut una mica estressant ("és", perquèestic a l'habitació de l'hotel ara!) i sé que aquests dies he tancat la llum de l'habitació tard i he obert la pantalla de l'ordinador d'hora.... (sorry!) però ens ho hem passat molt bé, no?! A sigut una manera diferent d'acabar l'etapa d'escriptura!! Gràcies!!).

També agraeixo als membres del grup del Joan més "antics": a l'Stéph, la Rana, el Fernando, la Laura, la Patry i el Joaquim, perquè en la etapa inicial que vam compartir em veu ajudar sempre que ho vaig necessitar, i als més nous Jorge, Koen i Paulina, per les vostres aportacions als lab meetings comuns.

Gràcies a tots els membres de l'Institut de Neurociències i del departament de Bioquímica i Biologia molecular, incloc a la gent de secretaria, als de comandes (que a vegades els hem fet parar bojos!), a les tècnics com la Cris que a cultius li donem molta feina o la Susana que sempre te solucions.

També gràcies als Investigadors Principals, perquè crec que a tots un dia o altre us he demanat alguna reactiu, consell, idea i, sobretot, als que heu participat en els lab meetings per les vostres aportacions.

Vull agrair a la gent amb qui hem compartit laboratori els últims dos anys i que han creat un bon ambient: gracias a Tina por todas las conversaciones que hemos tenido y tu ayuda cuando te he pedido algo (hasta me sacrificaste algún ratón muy al principio!), thank you to Zhou Xiangyu because talking to you is always funny, y a Nabil, ánimos que ya no te queda nada!

També agraeixo moltíssim que hi hagi vida més enllà del meu petit "cau" que és la poiata! Quina sort que, en sortir per la porta del lab, hi hagin altres portes d'altres labs perquè resulta que si les obres els labs estan plens de becaris! Vosaltres heu estat la part social de la tesi, m'alegro que hi hagi hagut gent amb qui compartir dinars sense parlar de feina, riure, parlar de feina quan era necessari i compartir festes: al Sergi, perquè si tu no m'haguessis dit que buscaven algú a la UAB, no crec que hagués trobat l'anunci i, probablement, no hagués fet aquesta tesi! Al Santi, per les llargues converses al despatx de dalt sobre una mica de tot. Al Rubén, perquè ets el millor!! Hem xerrat molt i molt bé i encara estic flipada amb els tupperes impressionants que et prepares! A l'Elsa, visca els aiguagims! A la Maria, a la Montse, a l'Alfredo,

a els Gerards, al Luís... a tots moltes gràcies perquè hem compartit molts bons moments i, en aquests anys, he après coses de cadascun de vosaltres.

Les meves nenes us mereixen un paràgraf separat. Moltes gràcies per incorporar-me a les vostres xerrades de cafè després de dinar que ens van permetre anar-nos coneixent! Rut, mil gràcies a la nostra gran època de gimnàs, on et vaig anar descobrint en les converses fins al saf i al vestuari, realment va ser quan hi anava més a gust!! T'he enyorat molt des que vas marxar... Tati, ets un amor... ha sigut fantàstic tenir una bessona de final de tesi, gràcies per les converses i les abraçades, has fet que aquests darrers mesos fossin molt agradables. A les dues, no sé que hagués fet sense vosaltres... de veritat. Gràcies per estar sempre allà, per ajudar-me amb dubtes científics quan els he tingut, per les nostres sessions de teràpia on sempre acabem rient, pel vostre suport i pel vostre carinyuuu!! Gràcies per tots els cafès i berenars al menjador diminut que s'han convertit en cerveses i sopars a llocs més guais! En fi, gràcies per assegurar que el meu dia a dia a l'Institut sempre tingués un moment per somriure. Crec que coincidir amb gent al lloc de treball que acabis considerant amic no és fàcil. Per això, sou una de les millors coses que m'emporto d'aquesta tesi, dues amigues.

I parlant d'amistat... gràcies a totes les amigues i els amics amb qui he compartit aquesta etapa: moltes gràcies a la "família" de Sant Cugat (StQ no seria tant súper guai sense vosaltres! =p !!!) i a la "família" de Sant Joan de l'Erm, per favor fem una escapada/excursió post-tesi!

Thank you erasmitos for all your support in my life and this PhD and for all the times you have sent me emails full of energy... no matter where you are, I feel you close all the time!

Molt especialment... Laureta, Ursu, Vio i Mine, moltíssimes gràcies nenis, que vosaltres heu escoltat totes les meves historietes de quan pensava si en fer la tesi, les de durant la tesi, i les de que vull fer després de la tesi i encara no he acabat!!! Espero que ens continuem explicant la vida en totes les etapes que anem vivint. Gràcies perquè sempre em doneu suport, sobretot quan faig allò que decideixo que el que acabo de decidir és la millor decisió del món i vaig a muerte amb allò trobant totes les coses positives! I vosaltres sou tant mones que us rieu i em dieu que endavant! Saber que sempre puc comptar amb vosaltres és un regal...

Vull agrair també a la meua família, a tota! Als avis que ja no hi són però que quan hi eren sempre estaven allà, a l'àvia Mercè que sempre em pregunta com em va per la universitat, a la família Abella perquè els ànims conjunts de tiets/tietes i cosins/cosines, ja sigui quan ens veiem o a través del súper *whatsapp* multitudinari que tenim, ajuden molt! A la família Casanelles, gràcies també pel vostre suport! Tieta Rocamora, la cervesa, ja! I una menció a la Tona, perquè quan hi eres, vas anar seguint tot el que jo anava fent, gràcies. I a la família Gil, perquè em pregunteu què faig, com em va i sempre em doneu ànims!

Molt especialment, al meu nucli familiar: als meus germans, Sergi i Joan. Sergi, gràcies per anar-me seguint des de NY i Joan, gràcies per escoltar-me tots els rotllos que t'explico de la tesi per aquí, tesi per allà, per trucar-me aquests dies que sabies que estava agobiada i per llegir-

te l'article i dir-me que no havies entès res però que les figures són boniques! I als meus papis, gràcies per escoltar les meves historietes, us he fet uns intensius que crec que ara ja sabeu tot el procés de publicació d'un article i el procés de dipòsit i defensa d'una tesi! Us agraeixo molt el vostre suport i que sempre m'ajudeu, en els estudis i en la vida.

I ja per acabar que sinó faré una altra tesi d'agraïments...

Estel, em falten paraules per agrair-te... et puc citar per començar? Estel, "sense tu aquesta tesi i moltes altres coses no s'haguessin fet realitat". Des del principi, em vas ajudar a decidir-me a fer una tesi i em vas donar ànims en tot moment. Has estat al meu costat tots i cadascun dels dies del meu doctorat, hem compartit laboratori i ets la millor companya amb qui podria treballar. Aquestes darreres setmanes t'has llegit la tesi i m'has fet correccions, les has introduït l'ordinador, has gastat un munt d'hores en fer-me el format i, sense tu, la portada probablement seria negra!! Amb tu al costat tot és molt fàcil. Al lab hi ha dies bons i dies dolents, però saber que en tornar a casa et veig m'assegura que el dia sempre acaba fantàsticament, és un plaer riure tant cada vespre i recarregar l'energia! Mil gràcies per estar al meu costat... t'estimo... =0

## AGRAÏMENTS

## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

## RESUM

## I INTRODUCCIÓ

---

1

### 1. Introducció a l'apoptosi

### 2. Què és l'apoptosi?

### 3. Significança de l'apoptosi i del seu correcte funcionament

### 4. Estructura genètica de l'apoptosi: *Caenorhabditis elegans*

### 5. Les Caspases

#### 5.1. Característiques i estructura

#### 5.2. Especificitat de substrat i selectivitat

#### 5.3. Classificació

#### 5.4. Mecanismes d'activació de les caspases

#### 5.5. Substrats de caspases a nivell cel·lular

#### 5.6. Inhibidors químics de les caspases

#### 5.7. Models genètics murins d'estudi de la funcionalitat de les caspases

### 6. Vies de regulació de l'apoptosi

#### 6.1. Proteïnes de la família de Bcl-2

- 6.1.1. Les proteïnes de la família de Bcl-2 com a dianes terapèutiques per al tractament de càncer

#### 6.2. Proteïnes inhibidores de l'apoptosi oIAPs

#### 6.3. Smac/DIABLO i Htr2A/Omi: antagonistes de les IAPs

### 7. Vies de senyalització de l'apoptosi

#### 7.1. La via extrínseca

- 7.1.1. Vies de senyalització dels receptors de mort

#### 7.2. La via intrínseca

- 7.2.1. Formació de l'apoptosoma

### 8. Altres vies de senyalització anti-apoptòtica: NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappaB*)

#### 8.1. Proteïnes de la via de transducció de senyal de NF- $\kappa$ B

8.2. Senyalització de la via de NF- $\kappa$ B

8.3. Models murins per a l'estudi de la funcionalitat de NF-  $\kappa$ B

8.4. NF- $\kappa$ B com a diana terapèutica

## **9. Alteració de les vies apoptòtiques en el desenvolupament del càncer**

9.1. GBM (glioblastoma multiforme) com a model tumoral de rellevància

9.1.1. Introducció al GBM

9.1.2. Biologia molecular del GBM

9.1.3. Models d'estudi del GBM

9.1.4. Tractament actual (i raons per la seva baixa eficiència)

9.1.5. Altres estratègies terapèutiques: TRAIL com a teràpia prometedora en el GBM

---

## **II ANTECEDENTS I OBJECTIUS** **85**

---

## **III MATERIALS I MÈTODES** **91**

### **1. Reactius**

### **2. Cultius cel·lulars**

### **3. Constructes plasmídics**

3.1. Preparació de bacteries quimio-competents

3.2. Mètode d'amplificació plasmídica: Transformació de DNA en *E. Coli*

3.3. Amplificació de plàsmids mitjançant mini o maxi cultius

### **4. Transfecció de siRNAs**

### **5. Preparació d'extractes citosòlics**

### **6. Extracció de proteïnes i Western blot**

### **7. Assaigs de supervivència cel·lular**

7.1. Reducció d'MTT (assaig de viabilitat cel·lular)

7.2. Assaig d'exclusió de Blau de Tripà

### **8. Assaig de mort cel·lular**

8.1. Tinció nuclear amb Hoechst 33258

8.2. Tinció cel·lular amb Iodur de propidi

### **9. Assaig d'activitat caspasa (DEVDasa)**

### **10. Immunofluorescència de la translocació nuclear de RelA/p65**

### **11. Assaig de la Luciferasa**

### **12. Anàlisi estadístic**

### **Captítol 1. Estudi dels mecanismes involucrats en la mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$ en un context on NF- $\kappa$ B està inhibit**

- 1.1. TNF $\alpha$  indueix apoptosi i no necroptosi en cèl·lules HeLa que sobre-expressen el SR-I $\kappa$ B $\alpha$
- 1.2. La baixada d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> és suficient per sensibilitzar les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$
- 1.3. TNF $\alpha$  indueix apoptosi i no necroptosi en cèl·lules HeLa quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada
- 1.4. La mort induïda per TNF $\alpha$  ocorre encara que NF- $\kappa$ B sigui funcional en cèl·lules HeLa on s'han silenciada els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>
- 1.5. Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B exerceixen els seus rols protectors respectius a través d'una via intracel·lular compartida
- 1.6. La mort induïda per TNF $\alpha$  ocorre encara que NF- $\kappa$ B sigui funcional en cèl·lules RD i DU-145 on s'han silenciada els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>

### **Capítol 2. Anàlisi de l'efecte de sensibilització a la mort induïda per TNF $\alpha$ produït pel silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> en un panell de línies cel·lulars**

### **Capítol 3. Estudi del Glioblastoma multiforme com a model tumoral que presenta resistència a l'activació de la via extrínseca**

- 3.1. Diferents línies de GBM mostren una resistència generalitzada en la resposta a l'estímul de TNF $\alpha$  inclòs quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> està regulada a la baixa
- 3.2. Les cèl·lules U87MG són resistents a la mort induïda per via extrínseca
- 3.3. Les cèl·lules U87MG poden ser sensibilitzades a la mort induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub>, però no Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, es troba silenciada de forma específica
- 3.4. La mort cel·lular induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada és dependent de caspases
- 3.5. La caspasa-8 és requerida com a caspasa iniciadora a l'hora de promoure la mort induïda per TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada
- 3.6. El silenciament d'Smac / DIABLO és suficient per revertir la mort induïda per TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> està regulada a la baixa

**Capítol 4. Caracterització de l'efecte citotòxic dels BH3-mimètics i del seu potencial sensibilizador a la mort cel·lular induïda per TRAIL en cèl·lules U87MG**

**Resultats annexes**

**V DISCUSSIÓ 171**

1. El silenciament de Bcl-xL sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  malgrat que NF- $\kappa$ B s'activi correctament en cèl·lules HeLa, RD i DU-145
2. El silenciament de Bcl-xL juga un rol específic que no és compartit per Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w en la sensibilització a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$
3. Els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 podrien no ser tant redundants com s'ha especulat fins ara
4. La resposta cel·lular de sensibilització o resistència a l'estímul de TNF $\alpha$  quan Bcl-xL està silenciada és dependent del tipus cel·lular
5. La mort induïda pel silenciament de Bcl-xL i l'estímul de TRAIL és apoptòtica i no necròtica
6. L'especificitat de Bcl-xL per protegir les cèl·lules U87MG de la mort cel·lular depèn de l'alliberament d'Smac / DIABLO
7. Caracterització de la mort induïda pels BH3-mimètics
8. Ús dels BH3-mimètics en el tractament del GBM

**VI CONCLUSIONS 199**

**VII BIBLIOGRAFIA 203**

**VIII ANNEX: Contribucions científiques 245**

1. Publicacions relacionades amb aquesta tesi
2. Currículum vitae abreujat







## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

<b>3HB:</b>	<u>3</u> - <u>h</u> ydroxyisob <u>u</u> turate dehydrogenase	<b>EGF:</b>	<u>e</u> pidermal growth <u>f</u> actor
<b>AIF:</b>	<u>A</u> ppoptosis <u>I</u> nducing <u>F</u> actor	<b>EGP2:</b>	<u>e</u> pithelial <u>g</u> lycoprotein <u>2</u>
<b>Apaf-1:</b>	<u>a</u> ppoptotic <u>p</u> rotease <u>-</u> activating factor	<b>EndoG:</b>	<u>E</u> ndonuclease <u>G</u>
<b>ASC:</b>	<u>a</u> ppoptosi-associated <u>s</u> peck-like protein containing a <u>C</u> ARD	<b>ERK/MAPK:</b>	Extracellular signal-regulated kinases /mitogen-activated protein kinases
<b>ATM:</b>	<u>a</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated	<b>FADD:</b>	<u>F</u> as <u>A</u> ssociated <u>D</u> eath <u>D</u> omain
<b>Bad:</b>	Bcl-2 associated death promoter	<b>FBS:</b>	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum
<b>BAF:</b>	<u>B</u> -cell <u>a</u> ctivating factor	<b>FLIP<sub>LVs</sub>:</b>	cellular <u>F</u> LICE-inhibitory protein
<b>Bak:</b>	<u>B</u> cl-2 homologous <u>a</u> ntagonist/ <u>k</u> iller	<b>GdH:</b>	<u>G</u> lutamate <u>d</u> ehydrogenase
<b>Bax:</b>	<u>B</u> cl-2-associated protein	<b>GEM:</b>	genetically <u>e</u> ngineered <u>m</u> ice
<b>Bcl-2:</b>	<u>B</u> -cell <u>l</u> ymphoma- <u>2</u> protein	<b>GBM:</b>	<u>G</u> lioblastoma <u>M</u> ultiforme
<b>B-CLL:</b>	<u>B</u> -cell chronic <u>l</u> ymphocytic <u>l</u> eukemia	<b>HCC:</b>	Hepatocellular carcinoma
<b>Bcl-w:</b>	B-cell lymphoma-w	<b>Hsp90:</b>	<u>H</u> eat <u>s</u> hock protein 90
<b>Bcl-x<sub>L</sub>:</b>	<u>B</u> -cell lymphoma-ex <u>t</u> ra <u>l</u> arge	<b>HtrA2/Omi:</b>	<u>H</u> igh- <u>T</u> emperature- <u>R</u> equirement Protein <u>A</u> 2
<b>Bfl-1/A1:</b>	BCL-2-related general <u>A</u> 1	<b>IAPs:</b>	<u>I</u> nhibitors of <u>A</u> ppoptosis <u>P</u> roteins
<b>BH:</b>	<u>B</u> cl-2 <u>h</u> omology	<b>IBM:</b>	<u>I</u> AP- <u>b</u> inding <u>m</u> otif
<b>BH3:</b>	<u>B</u> cl-2 <u>h</u> omology region <u>3</u>	<b>ICE:</b>	<u>i</u> nterleukin <u>1</u> $\beta$ <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme
<b>Bid:</b>	<u>B</u> H3- <u>i</u> nteracting <u>d</u> omain death agonist	<b>ich-1:</b>	ICE/CED human 1
<b>Bik:</b>	Bcl-2 interacting killer	<b>IFP:</b>	<u>I</u> ntestinal <u>f</u> luid <u>p</u> ressure
<b>BIR:</b>	<u>b</u> aculovirus <u>I</u> nhibitor-of-apoptosis protein repeat domain	<b>ILP2:</b>	<u>I</u> AP- <u>l</u> ike protein- <u>2</u>
<b>Bmf:</b>	Bcl-2 modifying factor	<b>IPAF:</b>	<u>i</u> nterleukin <u>1</u> B-converting enzyme (ICE)- protease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor
<b>BNIP3:</b>	BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3	<b>LRPPR:</b>	<u>L</u> eucine- <u>r</u> ich <u>p</u> entatricopeptide <u>r</u> epeat motif- containing protein
<b>Bok:</b>	Bcl-2 related ovarian killer	<b>LRR:</b>	<u>l</u> eucine- <u>r</u> ich <u>r</u> epeat
<b>Boo:</b>	Bcl-2 homolog of ovary	<b>LT<math>\beta</math>:</b>	limfotocina beta
<b>CARD:</b>	<u>c</u> aspase <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omain	<b>Mcl-1:</b>	myeloid cell Leukemia 1
<b>CARDINAL:</b>	CARD Inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B activating ligand	<b>MEKK3:</b>	<u>M</u> APK <u>k</u> inase <u>k</u> inase <u>3</u>
<b>CASBAH:</b>	<u>c</u> aspase <u>s</u> ubstrate <u>d</u> atabase <u>h</u> omepage	<b>ML-IAP:</b>	<u>m</u> elanoma <u>I</u> AP
<b>CED:</b>	<u>c</u> onvection- <u>e</u> nhanced <u>d</u> elivery	<b>MLS:</b>	<u>M</u> itochondrial <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal)
<b>ciAP1:</b>	<u>c</u> ellular <u>I</u> nhibitor of <u>a</u> ppoptosis <u>p</u> rotein- <u>1</u>	<b>MMP-2:</b>	<u>m</u> atrix <u>m</u> etalloproteinase- <u>2</u>
<b>ciAP2:</b>	<u>c</u> ellular <u>I</u> nhibitor of <u>a</u> ppoptosis <u>p</u> rotein- <u>2</u>	<b>MOMP:</b>	<u>m</u> itochondrial <u>o</u> uter <u>m</u> embrane permeabilization
<b>CK2:</b>	<u>c</u> asein <u>k</u> inase- <u>2</u>	<b>MRI:</b>	<u>M</u> agnetic <u>r</u> essonance <u>i</u> maging
<b>CLPX:</b>	Caseolytic Peptidase X Homolog	<b>mTOR:</b>	<u>m</u> amalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>R</u> apamycin
<b>CNS:</b>	<u>C</u> entral <u>N</u> ervous <u>S</u> ystem	<b>Nacht:</b>	<u>N</u> TPases implicated in <u>a</u> ppoptosi and multi <u>h</u> isto <u>c</u> ompatibility complex
<b>CYLD:</b>	<u>c</u> ylindromatosis gene product	<b>Naip:</b>	<u>n</u> euronal <u>I</u> nhibitor of <u>a</u> ppoptosis protein
<b>DCP-1:</b>	<u>D</u> rosophila <u>c</u> aspase- <u>1</u>	<b>NALP3:</b>	<u>N</u> acht <u>l</u> eucine-rich repeat protein)
<b>DD:</b>	<u>D</u> eath <u>D</u> omain	<b>NB:</b>	<u>N</u> aphtol <u>b</u> lue
<b>DED:</b>	<u>d</u> eath <u>e</u> ffector <u>d</u> omain	<b>NEAA:</b>	<u>N</u> on <u>e</u> ssential <u>a</u> mino <u>a</u> cids
<b>DISC:</b>	<u>d</u> eath <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex	<b>NEMO:</b>	NF- $\kappa$ B essential modifier
<b>DMSO:</b>	<u>D</u> imethylsulfoxid	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	<u>N</u> uclear <u>f</u> actor- <u>K</u> appa <u>B</u>
<b>DRs:</b>	<u>D</u> eath <u>R</u> eceptors	<b>NIK:</b>	<u>N</u> F- $\kappa$ B- <u>i</u> nducing <u>k</u> inase
<b>DREDD:</b>	<u>d</u> eath-related <u>ced</u> -3/ <u>Nedd2</u> -like gene	<b>NLRs:</b>	<u>N</u> OD- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptors
<b>DRICE:</b>	<u>D</u> rosophila <u>I</u> CE	<b>NLS:</b>	<u>N</u> uclear <u>L</u> ocalization <u>S</u> equences
<b>DRONC:</b>	<u>D</u> rosophila <u>Nedd2</u> -like <u>c</u> aspase	<b>NOD:</b>	<u>n</u> ucleotide-binding and <u>o</u> ligomerization domain
<b>DSS:</b>	<u>d</u> extran <u>s</u> ulphate <u>s</u> odium		
<b>EBV:</b>	virus de l'Epstein-Barr		

**Noxa:** sinònim de PMAIP1, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

**Ns siRNA:** Nonsense siRNA

**Nsp3 i 4:** Nipsnap 3 i 4

**PAMPs:** Pathogen-associated molecular patterns

**PBS:** Phosphate buffered saline

**PCD:** programmed cell death

**PED/PEA-15:** phosphoprotein enriched in diabetes/astrocytes

**PIDD:** p-53 induced death domain

**pO<sub>2</sub>:** tissue oxygen level

**PTEN:** phosphatase and tensin homolog

**Puma:** p53 upregulated modulator of apoptosis

**RHD:** Rel homology domain

**RIP:** receptor-interacting protein

**ROS:** reactive oxygen species

**SEM:** Standard error of the mean

**siRNAs:** short interference RNA

**Smac/DIABLO:** Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/Direct IAP binding protein with low pI

**TACE:** metalloprotease TNF $\alpha$  converting enzyme

**TAD:** Transcription activation domains

**TAK1:** TGF- $\beta$ -activated kinase 1

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor- $\beta$

**TM:** transmembrane domain

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TRADD:** TNFR-Associated Death Domain

**TRAF:** TNF Receptor-Associating Factors

**TRAIL:** Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand

**UBA:** ubiquitin-associated

**uPA:** urokinase-type plasminogen activator

**VEGF:** vascular endothelial growth factor

**Vegi:** Vascular endothelial cell growth Inhibitor

**WHO:** World Health Organisation

**w/o:** without

**XIAP:** X-linked Inhibitor of apoptosis protein







# Resum





## RESUM

L'activació de la via extrínseca de l'apoptosi és promoguda per l'activació dels anomenats "receptors de mort". En aquest treball demostrem que l'expressió d'un súper-repressor d'NF- $\kappa$ B (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ ) sensibilitza a les cèl·lules HeLa a l'apoptosi, però no a la necroptosi, induïda per TNF $\alpha$ . Aquest procés involucra l'activació de les caspases i l'alliberament del citocrom c de la mitocòndria. El silenciament específic de cada un dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 indica que Bcl-x<sub>L</sub> té un rol específic i no redundant en la regulació de l'activació de la via de supervivència o de mort induïda per TNF $\alpha$ , sense alterar l'activació d'NF- $\kappa$ B. En aquest context, es mostra que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no impedeix la regulació a l'alça, induïda per TNF $\alpha$ , de cIAP2, un gen diana d'NF- $\kappa$ B. A més a més, el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no incrementa el percentatge de nuclis apoptòtics en front a l'estímul de TNF $\alpha$  en cèl·lules que sobre-expressen el SR-I $\kappa$ B $\alpha$ . A més, aquests resultats han estat corroborats en altres línies tumorals, com les cèl·lules RD i DU-145, demostrant que esdevenen sensibles a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada, sense afectar a l'activació d'NF- $\kappa$ B. En conjunt, aquests resultats suggereixen que quan Bcl-x<sub>L</sub> no és funcional, NF- $\kappa$ B no pot exercir el seu rol protector encara que la seva activitat transcripcional no es vegi alterada. D'altra banda, estudiant un panell més estens de línies cel·lulars amb TNF $\alpha$ , també s'ha pogut establir que algunes d'elles són resistents a l'acció de la citoquina malgrat el silenciament de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> com, per exemple, la majoria de les línies cel·lulars derivades de glioblastoma multiforme humà (GBM). En canvi, utilitzant com a model cel·lular de GBM les cèl·lules U87MG, s'ha demostrat que aquestes esdevenen sensibles a l'acció de TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>, però no de Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, es troben silenciada. Aquesta mort cel·lular és de tipus apoptòtic i involucra, tant l'activació de caspases com l'alliberament de citocrom c i Smac / DIABLO de la mitocòndria. El silenciament d'Smac / DIABLO és capaç de revertir la sensibilització provocada per la disminució en els nivells de Bcl-x<sub>L</sub> en front a l'estímul citotòxic de TRAIL, malgrat les caspases esdevenint processades en els seus fragments d'activació. En conjunt, els resultats presentats en aquesta tesi demostren que la proteïna anti-apoptòtica Bcl-x<sub>L</sub> juga un paper clau no redundant en l'apoptosi induïda per via extrínseca i que la funció de protecció exercida per Bcl-x<sub>L</sub> recau en la inhibició de l'alliberament d'Smac / DIABLO cap al citosol.

## ABSTRACT

The activation of the extrinsic pathway is promoted when the death receptors are triggered. In the present study we demonstrate that the expression of a super-repressor of NF- $\kappa$ B (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ ) sensitizes HeLa cells towards apoptosis, but not necroptosis, induced by TNF $\alpha$ . This process involves both the activation of caspases and the release of cytochrome c from the mitochondria. The specific knockdown of each anti-apoptotic member of the Bcl-2 family unravels a specific and non-redundant role of Bcl-x<sub>L</sub>, which regulates the TNF $\alpha$ -mediated switch between cell survival and cell death without affecting NF- $\kappa$ B activation. In this context, we show that the silencing of Bcl-x<sub>L</sub> does not impair TNF $\alpha$ -mediated cIAP2 upregulation, a well-known NF- $\kappa$ B gene target. Furthermore, Bcl-x<sub>L</sub> knockdown does not raise the number of apoptotic nuclei in SR-I $\kappa$ B $\alpha$ -transformed cells after TNF $\alpha$  challenge. Finally, we corroborate these results to other kinds of tumoral cells such as RD and DU-145, showing that both become sensitive to TNF $\alpha$  when Bcl-x<sub>L</sub> is downregulated without affecting NF- $\kappa$ B activation. Altogether, these results suggest that when Bcl-x<sub>L</sub> function is impaired, NF- $\kappa$ B cannot exert its protective role, even though its transcriptional function remains unaltered. Otherwise, the use of a more extensive panel of cell lines cultured in the presence of TNF $\alpha$ , allowed us to establish that some of them are resistant to the cytotoxic effect of the cytokine, even when Bcl-x<sub>L</sub> is downregulated. However, we wanted to ascertain whether these Bcl-x<sub>L</sub>-silenced TNF $\alpha$ -resistant cells were also insensitive to other death ligands, such as TRAIL. Among those cells, we were interested in human glioblastoma multiforme (GBM)-derived cell lines. By using U87MG cells as a cellular model of GBM-derived cells, we show that the specific knockdown of Bcl-x<sub>L</sub>, but not that of Bcl-2, Bcl-w or Mcl-1, renders cells sensitive to TRAIL-induced apoptosis. This cell death is apoptotic and involves the activation of caspases and the cytosolic release of both cytochrome c and Smac / DIABLO from the mitochondria. The downregulation of Smac / DIABLO is able to prevent the sensibilization afforded by Bcl-x<sub>L</sub> knockdown towards TRAIL-mediated cytotoxicity, even though the caspases become processed into their active fragments. Overall, the results presented in this dissertation demonstrate that, first, the anti-apoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> plays a key and non-redundant role in the execution of the apoptotic program induced by the activation of the death receptors and, second, that the protective function exerted by Bcl-x<sub>L</sub> relies on the prevention of Smac / DIABLO release to the cytosol.





*I.*

Introducció

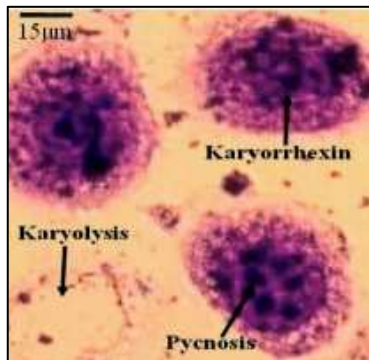


Hi ha una antiga dita Japonesa que diu que “Un cop entrem en el món dels vius, inevitablement morirem”. Aquesta dita que es refereix als éssers humans, traduïda a la biologia es refereix a les cèl·lules que constitueixen els nostres cossos. A través de repetides divisions cel·lulars (mitosis), un òvul fertilitzat produeix bilions de cèl·lules que constituïran el cos humà. Durant aquest procés, es generen cèl·lules en excés i cèl·lules aberrants que és necessari eliminar, ja que si no, no seriem organismes viables. Per aquest motiu, existeix un complex mecanisme de mort cel·lular programada indispensable per al desenvolupament embrionari i el manteniment de la homeòstasi tissular de tots els organismes superiors.

## **1. Introducció a l'apoptosi**

A mitjans del segle XIX, un cop va ser acceptat que els organismes estan constituïts de cèl·lules, es va descobrir que la mort cel·lular juga un rol important durant els processos fisiològics dels organismes pluricel·lulars, particularment durant l'embriogènesi i la metamorfosis (Clarke and Clarke 1996). La primera observació de mort cel·lular fisiològica la va realitzar Vogt al 1842 durant la metamorfosis dels amfibis i més tard, al 1951, Glucksmann ho va observar com un fet normal en invertebrats i vertebrats. Més endavant, es va descriure que inhibidors de la síntesi de RNA i de la síntesi proteica eren capaços d'inhibir la mort cel·lular durant la metamorfosis d'amfibis (Tata 1966) i insectes (Lockshin 1969), indicant que la mort cel·lular requereix d'un procés de síntesi macromolecular. Walter Flemming, autor que va introduir els termes cromatina i mitosi, al 1885 va observar cèl·lules que posseïen un nucli que semblava fragmentat. Va anomenar aquest procés (que avui en dia coneixem com a apoptosi) cromatòlisi, referint-se al fet que els nuclis fragmentats acabaven desapareixent (Publicat a Arch Anat EntwGesh 1885, 221-244). Al 1879, Edwing Klebs va proposar el terme cariòlisi per definir un eixamplament nuclear amb una pèrdua eventual de la seva cromatina i, el terme cariorrexis, per definir un trencament de l'envolta nuclear acompanyada d'una desintegració de la cromatina en forma de grànuls. Al 1890, altres autors van introduir la paraula picnosis per definir una reducció de la mida nuclear amb condensació de la cromatina. Uns anys més tard, al 1900, es va consolidar el terme d'autòlisi per

definir la digestió espontània de les cèl·lules i els teixits per l'acció dels seus propis enzims proteolítics. Aquests termes encara són vigents avui en dia per descriure diferents etapes del procés necròtic i les diferents morfologies que adopta un nucli apoptòtic (Figura I1).



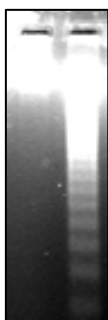
**Figura I1.** Imatge il·lustrativa dels termes utilitzats per descriure les diferents morfologies que pot adoptar un nucli en front a un estímul de mort. Cèl·lules PC3 van ser tractades amb extractes metanòlics de llavors de *N. Sativa* i tenyides amb cristall de violeta. (Imatge modificada de Shafi *et al*, 2008. Extret de <https://journaldatabase.org/>).

La terminologia de “mort cel·lular programada” (PCD, de l’anglès *programmed cell death*) es va introduir al 1964, proposant que la mort cel·lular durant el desenvolupament no es produeix de forma accidental sinó que segueix una seqüència d’esdeveniments controlats que donen lloc a l’autodestrucció cel·lular en llocs i moments programats (Lockshin and Williams 1965). També es va descobrir que, en sistemes embrionaris, la mort cel·lular pot ser evitada per substàncies alliberades per altres teixits propers, indicant així, que la mort cel·lular no és inevitable i pot ser suprimida per senyals provinents d’altres cèl·lules (Saunders 1966).

Kerr, Wyllie i Currie al 1972 van introduir el terme apoptosi, l’etimologia de la qual prové del grec i significa “caiguda de les fulles dels arbres”, per descriure la mort cel·lular associada al desenvolupament animal i a la homeòstasis tissular, així com la mort que es produeix en determinades patologies. Uns anys més tard, tres grups independents (al 1976 (Skalka, Matyasova *et al.* 1976) i al 1981 (Yamada, Ohyama *et al.* 1981, Zhivotovsky, Zvonareva *et al.* 1981)), van analitzar electroforèticament la cromatina de teixits limfoides irradiats i van observar que es degradava en fragments petits que originaven un patró típic en forma d’escala (en anglès: *ladder*). Aquests fragments petits es van identificar com a múltiples dels nucleosomes (Zhivotovsky, Zvonareva *et al.* 1981). Va ser al 1984 quan, Wyllie i col·laboradors, van associar el patró de ladder com un marcador bioquímic específic de l’apoptosi (Wyllie, Morris *et al.* 1984) (Figura I2).



Això va promoure els estudis en el camp de l'apoptosi i, en poc temps, es van identificar, per exemple, els gens cel·lulars implicats en l'apoptosi en el nemàtode *C.elegans* (Ellis and Horvitz 1986). Més tard, es van descobrir en mamífers els gens homòlegs de *C.elegans* i les proteïnes que codifiquen, entre les quals podem esmentar com a component més rellevant un conjunt d'enzims proteolítics anomenats caspases (de l'anglès, *cysteinyl aspartate-specific proteinases*) (Alnemri, Livingston *et al.* 1996).



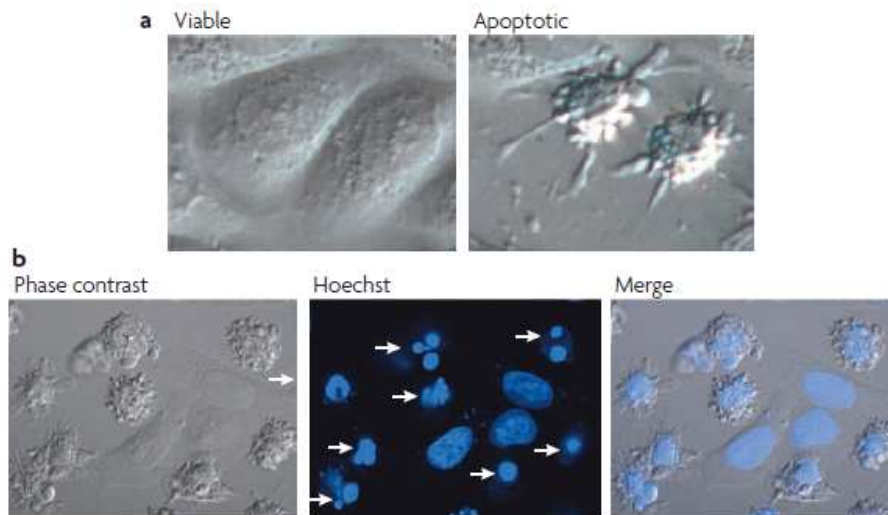
**Figura I2. Faragmentació de l'ADN en forma d'escala (*ladder*).** Cèl·lules SH-SY5Y van ser tractades o no amb un inductor apoptòtic. El primer carril correspon a cèl·lules sense tractar i el segon carril a cèl·lules tractades amb l'inductor apoptòtic durant 24 h. (Resultat obtingut al laboratori durant l'execució experimental de la tesi).

## 2. Què és l'apoptosi?

La definició d'apoptosi prové de les característiques morfològiques descrites per Kerr, Wyllie i Currie al 1972. Així doncs, l'apoptosi es caracteritza per: una disminució i densificació del volum cel·lular, la condensació del citoplasma, reducció de la mida nuclear amb marginalització i condensació de la cromatina (picnosi), la posterior fragmentació nuclear (cariorexis), la fragmentació de la cromatina en forma de *ladder*, aparició de protuberàncies en la membrana citoplasmàtica anomenades *budding* o *blebbing*, la formació dels cossos apoptòtics mantenint la integritat dels orgànuls i de la membrana plasmàtica i la fagocitosis d'aquests cossos apoptòtics per part dels macròfags o de les cèl·lules veïnes (Figura I3).

El fet que els orgànuls citoplasmàtics no pateixin modificacions estructurals importants i que la membrana citoplasmàtica es mantingui pràcticament intacta fins als estadis finals del procés, fa que no hi hagi vessament del contingut cel·lular a l'espai extracel·lular, evitant així la resposta inflamatòria (Kerr, Wyllie *et al.* 1972) (Figura I4). Al cap de poques hores que una cèl·lula hagi iniciat el procés apoptòtic, aquesta haurà desaparegut per complet sense deixar cap rastre. Amb aquesta definició la van diferenciar d'aquella mort

patològica que es dona en lesions agudes de trauma o isquèmia. En aquest cas, els orgànuls s'inflen i es trenquen en un procés anomenat necrosi. L'alliberament del contingut cel·lular durant la necrosi pot induir una resposta inflamatòria (Kerr, Wyllie *et al.* 1972) (Figura I4).

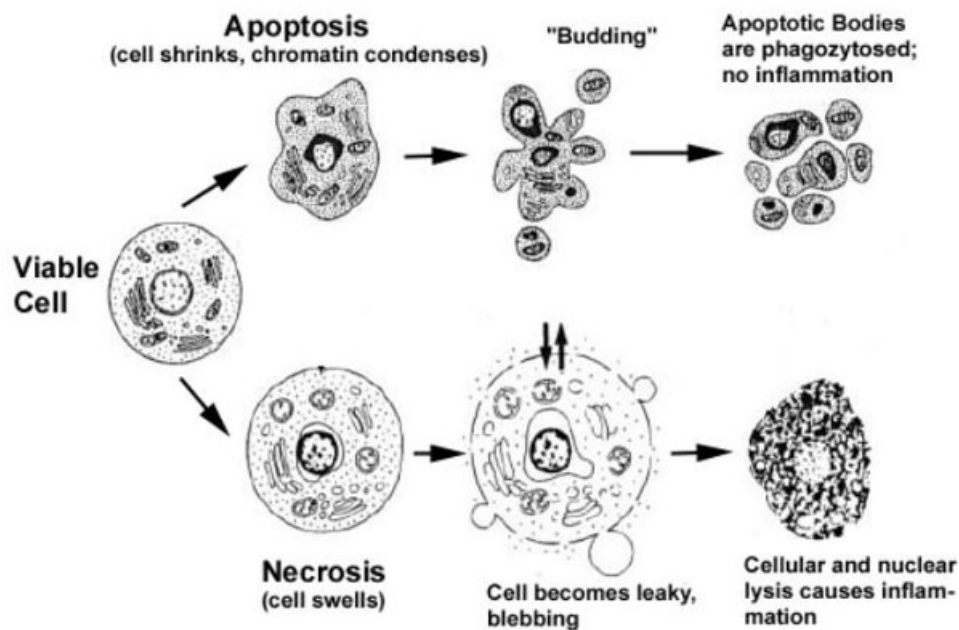


**Figura 13. Morfologia de l'apoptosi.** a) Comparació de la morfologia de cèl·lules HeLa viables (panell esquerre) i cèl·lules HeLa exposades a un inductor apoptòtic que mostren la típica morfologia apoptòtica amb retracció cel·lular i protuberàncies a la membrana plasmàtica evidents (*budding*) (panell dret). b) Característiques de la condensació i fragmentació nuclears. Les cèl·lules HeLa es van tractar amb un inductor apoptòtic i posteriorment es va realitzar una tinció nuclear amb Hoechst. Per poder comparar, es mostra una barreja de cèl·lules viables i apoptòtiques. Les cèl·lules apoptòtiques (senyalades amb fletxes) mostren un *budding* extensiu i contenen nuclis que estan condensats i/o fragmentats en diversos cossos apoptòtics. Modificat de (Ponassi, Biasotti *et al.* 2008).

Cal fer un incís per explicar que, tot i que tradicionalment es considerava un tipus de mort no controlada, s'ha demostrat que la necrosi és un procés altament regulat (Golstein and Kroemer 2007). A més a més, recentment s'ha caracteritzat una forma de necrosi programada anomenada necroptosi (Wu, Liu *et al.* 2012). Les característiques morfològiques presents en la necrosi i en la necroptosi són les mateixes, però la necroptosi té una via de senyalització pròpia: és induïda per l'estimulació de "receptors de mort" com TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL i requereix la interacció amb les quinases RIP1 i RIP3. A més, pot ser inhibida específicament per les necrostatines (Holler, Zaru *et al.* 2000, Degterev,

Hitomi *et al.* 2008). Les investigacions recents en quant a la funcionalitat de la necroptosi, apunten que està implicada en el procés de regulació del desenvolupament del sistema immune i que podria accelerar la mort de les cèl·lules cancerígenes o augmentar la seva sensibilitat a determinats tractaments (Wu, Liu *et al.* 2012).

Tornant a l'apoptosi, donat que les seves característiques morfològiques típiques es van trobar en diferents tipus cel·lulars i teixits en resposta a diferents estímuls (Kerr, Wyllie *et al.* 1972, Kerr, Harmon *et al.* 1974, Lockshin and Zakeri 2001), Kerr i els seus col·laboradors van proposar l'existència d'un programa de mort cel·lular conservat en tots els organismes pluricel·lulars. Així doncs, van establir l'ús de la terminologia PCD com a sinònim d'apoptosi i contrari a la necrosi.

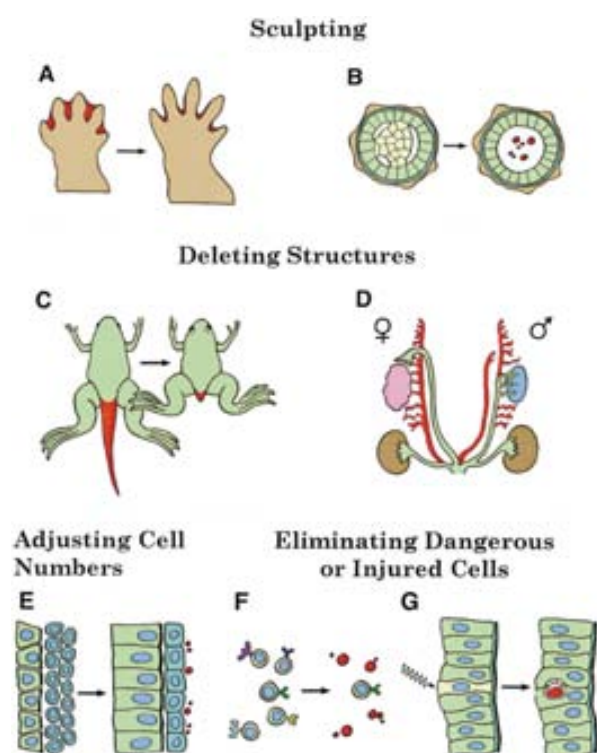


**Figure 14. Característiques de la mort apoptòtica i necròtica.** L'apoptosi es caracteritza per la disminució del volum cel·lular, condensació i marginalització de la cromatina a la perifèria nuclear i la formació de protuberàncies a la membrana o cossos apoptòtics que contenen orgànuls, citosol i fragments nuclears que seran fagocitats sense desencadenar cap resposta inflamatòria. Durant el procés de necrosi, la cèl·lula augmenta el volum cel·lular, es dilaten els orgànuls i la membrana s'acaba desintegrant alliberant el contingut cel·lular a l'espai intercel·lular causant una resposta inflamatòria. Modificat de (Van Cruchten and Van Den Broeck 2002).

Des de llavors, la comunitat científica ha aprofundit en l'estudi de l'apoptosi i al llarg dels anys, s'ha demostrat que no tota la mort apoptòtica és conseqüència d'un programa genètic temporal i que existeixen altres tipus de mort no apoptòtica que també tenen significança biològica. Això ha comportat una revisió del terme PCD que avui en dia es refereix a qualsevol tipus de mort mediada pel programa de mort intracel·lular, independentment de l'estímul que la causa i de si presenta o no totes les característiques típiques de l'apoptosi (Jacobson, Weil *et al.* 1997).

### 3. Significança de l'apoptosi i del seu correcte funcionament

Durant el desenvolupament, es produeixen moltes cèl·lules en excés que en ser eliminades donaran la forma final de l'òrgan al qual pertanyen (Meier, Finch *et al.* 2000). Exemples clars es troben en el cervell, on la meitat de les neurones creades inicialment acabaran morint (Hutchins and Barger 1998) i en el desenvolupament diferencial dels òrgans reproductors masculí i femení (Meier, Finch *et al.* 2000). Un altre exemple clar en el desenvolupament, és el procés de formació de díits lliures i independents a conseqüència de la mort cel·lular massiva del teixit mesenquimal interdigital (Zuzarte-Luis and Hurlle 2002) (Figura 15). Finalment, un últim exemple a destacar és la mort de més del 95% dels



**Figura 15. Algunes funcions de PCD en el desenvolupament animal.** (A i B) Eliminació de cèl·lules en excés per donar la forma final als òrgans. (C i D) Eliminació d'estructures no desitjades. (E) Control del nombre cel·lular. (F i G) Eliminació de cèl·lules no funcionals, anormals o potencialment danyines. Modificat de (Jacobson, Weil *et al.* 1997).

timòcits en el timus durant la seva maduració (Nagata 1997).

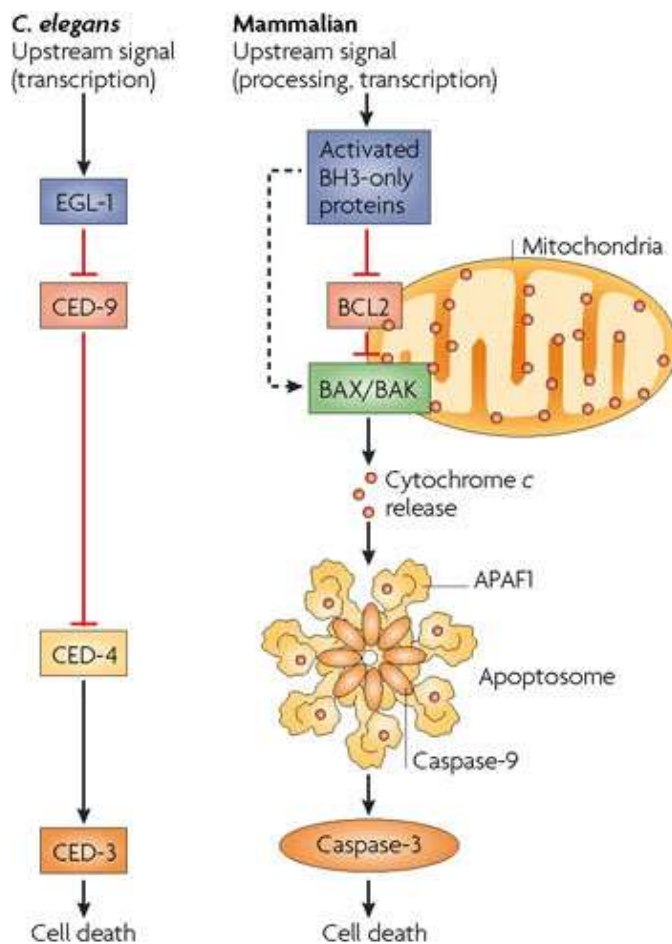
Així doncs, veiem que els processos apoptòtics estan involucrats en desenvolupament, diferenciació, proliferació / homeòstasis, regulació i funció del sistema immunitari i en l'eliminació de cèl·lules en excés o mal funcionals. És per això, que la disregulació de l'apoptosi comporta nombroses patologies. D'una banda, l'expressió forçada de proteïnes (d'ara en endavant, sobre-expressió) que comporten una apoptosi excessiva està associada amb patologies degeneratives com el Parkinson o l'Alzheimer, amb patologies d'isquèmia, o amb el SIDA. D'altra banda, la inhibició de l'apoptosi mitjançant la sobre-expressió de proteïnes anti-apoptòtiques és un dels desencadenants de malalties proliferatives com el càncer, de malalties autoimmunes i de determinades infeccions virals (Cory, Huang *et al.* 2003).

#### **4. Estructura genètica de l'apoptosi: *Caenorhabditis elegans***

La caracterització dels components moleculars de la via apoptòtica han tingut la seva base en els estudis genètics portats a terme en *Caenorhabditis elegans* (Ellis and Horvitz 1986). Durant el seu desenvolupament, *C. elegans* segueix un patró invariable de PCD on 131 cèl·lules, d'un total de 1090, moren donant lloc a l'individu adult amb 959 cèl·lules. Sydney Brenner va fer servir aquest model per definir gens específics clau en el desenvolupament (Brenner 1974). John Sulston va fer un mapa de les cèl·lules del nemàtode i va demostrar que sempre morien les mateixes cèl·lules de forma específica (Levy, Gilgun-Sherki *et al.* 2005). Finalment, H. Robert Horvitz va mutegenitzar *C. elegans* amb l'objectiu de trobar els gens responsables de les 131 morts somàtiques (Ellis and Horvitz 1986, Ellis, Jacobson *et al.* 1991). La transcendència d'aquests descobriments va fer que s'atorgués als tres científics el Premi Nobel en Fisiologia o Medicina al 2002.

L'anàlisi genètic de mutants defectius en mort cel·lular, va permetre identificar gens específics per a la regulació, execució i resolució de l'apoptosi. *Ced-3*, *ced-4* i *egl-1* són indispensables per a la mort cel·lular, mentre que *ced-9*, descobert amb un mutant de guany de funció, és requerit per prevenir la mort cel·lular. En *C. elegans*, l'activació de la PCD està controlada de forma senzilla

(Figura 16). La iniciació de l'apoptosi està regulada per la *upregulació* transcripcional de *egl-1*, que en unir-se a *ced-9*, neutralitza la inhibició que *ced-9* exerceix sobre la proteïna adaptadora *ced-4*. Així, *ced-4* pot unir i activar la Cys proteasa *ced-3* que podrà processar múltiples substrats específics per a executar la mort cel·lular.



**Figura 16.** La comparació en paral·lel de la via de les proteïnes CED en *C. elegans* i de la maquinària apoptòtica central en mamífers, indica una conservació general de la via. S'observa en cada pas de la via una extensió de la maquinària apoptòtica, incloent múltiples proteïnes de la família de Bcl-2, una complexa regulació d'aquesta família i l'alliberament de citocrom c de la mitocondria. Aquest últim fet conduirà a la formació de l'apoptosoma i la conseqüent activació de les caspases. Existeix una complexitat afegida degut a la presència de múltiples membres de cada classe de reguladors apoptòtics. La línia puntejada indica una possible activació directa de Bax i Bak per part de les proteïnes *BH3-only*. Font: (Degterev and Yuan 2008).

Degut a l'elevada conservació evolutiva dels mecanismes executors de l'apoptosi, s'han pogut descriure homòlegs per als gens de *C. elegans* en diferents espècies com per exemple *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* o *Saccharomyces cerevisiae* (Hengartner 2000). En el cas dels mamífers, s'han identificat proteïnes homòlogues als gens de *C. elegans* (Nicholson and Thornberry 1997, Kelekar and Thompson 1998) pertanyents a diferents famílies:

- Homòlegs de CED-3: la família de les caspases (Fernandes-Alnemri, Litwack *et al.* 1994), (veure apartat "Les caspases")

- Homòlegs CED-4: Apaf-1 (Zou, Henzel *et al.* 1997)
- Homòlegs de CED-9: la família de Bcl-2 (Hengartner and Horvitz 1994), (veure apartat “Proteïnes de la família de Bcl-2”)
- Homòlegs de EGL-1: subfamília de proteïnes BH3-only (BH3, de l'anglès, *Bcl-2 homology region 3*) (veure apartat “Proteïnes de la família de Bcl-2”).

## 5. Les caspases

Les proteïnes requerides per a la iniciació i execució de l'apoptosi pertanyen a una família d'enzims proteolítics altament conservada anomenada caspases. La seva acció, genera canvis bioquímics a les cèl·lules apoptòtiques com la reducció del potencial de membrana, la producció de radicals oxidants, l'acidificació intracel·lular, l'externalització de residus de fosfatidilserina de la bicapa lipídica a la membrana plasmàtica, la proteòlisi de determinades proteïnes cel·lulars, la degradació de la cromatina en fragments oligonucleosomals i el consum d'ATP (Cryns and Yuan 1998).

El clonatge i la caracterització de *ced-3* al 1989, va ser clau per indagar en el procés de mort apoptòtica. *Ced-3* codifica per una proteïna de mamífers, l'enzim convertidor interleukina 1 $\beta$  (ICE, de l'anglès, *interleukin 1 $\beta$  converting enzyme*), encarregada de la maduració proteolítica d'IL-1 $\beta$  i involucrada en inflamació. ICE va esdevenir el primer membre (caspasa-1) de la família de les caspases (Black, Kronheim *et al.* 1989, Kostura, Tocci *et al.* 1989). Aquest descobriment va ser el desencadenant de la identificació de proteases similars a CED-3 i ICE durant l'apoptosi. Al 1994, es va construir el primer model en tres dimensions de caspasa-1 i es va identificar el primer homòleg de caspasa en mamífers: ich-1 (de l'anglès, *ICE/CED human 1*) (actual caspasa-2) (Wang, Miura *et al.* 1994). També es va identificar l'homòleg de CED-3 en mamífers que es va anomenar CPP32, apopaina o Yama (Fernandes-Alnemri, Litwack *et al.* 1994, Tewari, Quan *et al.* 1995) i que actualment s'anomena caspasa-3. Un any més tard es va descriure el sistema de proteòlisi específica de les caspases (Nicholson, Ali *et al.* 1995). Com que entre el 1995 i el 1996 es van identificar 8 membres més de la família, al 1996 Alnemri i col·laboradors van proposar el terme caspases (de l'anglès *cysteinyl aspartate-specific proteinases*) per englobar a tots els membres d'aquesta nova família de proteases en aspàrtic

dependents d'un residu de cisteïna per proteolitzar les proteïnes (c de cisteïna, asp d'aspàrtic, i asa d'enzim).

S'ha demostrat que les caspases són elements conservats al llarg de l'evolució en diferents espècies i que existeix una clara tendència evolutiva a incrementar el nombre de caspases en la filogènia, des de dues en plantes, quatre a *C. elegans*, set en *Drosophila* i onze en ratolins i humans (Lamkanfi, Declercq *et al.* 2002). Així, en plantes es van descobrir dos tipus d'activitats similars a les caspases, les metacaspases i les paracaspases, dos classes de gens que comparteixen característiques estructurals i mecanístiques amb les caspases dels metazous (Uren, O'Rourke *et al.* 2000). En *Drosophila*, s'han identificat set caspases de les quals quatre participen en la PCD: DCP-1 (de l'anglès, *Drosophila caspase-1*) (Song, McCall *et al.* 1997), DRONC (de l'anglès, *Drosophila Nedd2-like caspase*) (Dorstyn, Colussi *et al.* 1999), DRICE (de l'anglès, *Drosophila ICE*) (Fraser, McCarthy *et al.* 1997) y DREDD (de l'anglès, *death-related ced-3/Nedd2-like gene*) (Chen, Rodriguez *et al.* 1998). En vertebrats no mamífers, s'han identificat més de 25 caspases ortòlogues / homòlogues diferents. Cal destacar que la caspasa més primitiva identificada en *amphioxus* es va denominar AmphiCASP3 / 7 i correspon a la forma primitiva comuna de les caspases executores -3 i -7 prèvia a la duplicació gènica específica observada en vertebrats (Bayascas, Yuste *et al.* 2002). En el cas dels humans, s'han identificat 11 caspases (caspases1-10 i caspasa 14 (Alnemri, Livingston *et al.* 1996, Pistritto, Jost *et al.* 2002). La proteïna inicialment denominada caspasa-13, finalment va resultar ser l'homòleg boví de caspasa-4 (Koenig, Eckhart *et al.* 2001) i la caspasa-11 s'ha descrit en ratolí i el més probable és que sigui l'homòleg de caspasa-5 humana (Degterev, Boyce *et al.* 2003). En el cas de la caspasa-12, s'expressa en la majoria d'individus com una proteïna truncada i catalíticament inactiva (caspasa-12S) (Fischer, Koenig *et al.* 2002) tot i que un grup d'individus descendents d'africans n'expressen la forma completa (caspasa-12L) i sembla que, per exemple, és capaç d'atenuar la resposta immune inflammatòria i innata en front a endotoxines i, en fer-ho, podria esdevenir un factor de risc per desenvolupar el síndrome de la resposta sistèmica inflammatòria (Saleh, Vaillancourt *et al.* 2004, Yeretssian, Doiron *et al.* 2009).



## 5.1. Característiques i estructura

Les diferents caspases es troben organitzades de manera similar i totes comparteixen una sèrie de característiques. En primer lloc, com a enzims proteolítics comparteixen característiques generals de les proteases:

- La seva síntesi és en forma de precursors o zimògens que tenen una activitat molt reduïda o nul·la. Aquests es poden activar per auto-proteòlisi o poden ser proteolitzats per una altra proteasa.
- La seva activació està altament regulada
- Els canvis que provoquen són irreversibles.

En segon lloc, posseeixen característiques específiques de les caspases que els hi confereixen una alta especificitat i una estricta regulació (Figura 15):

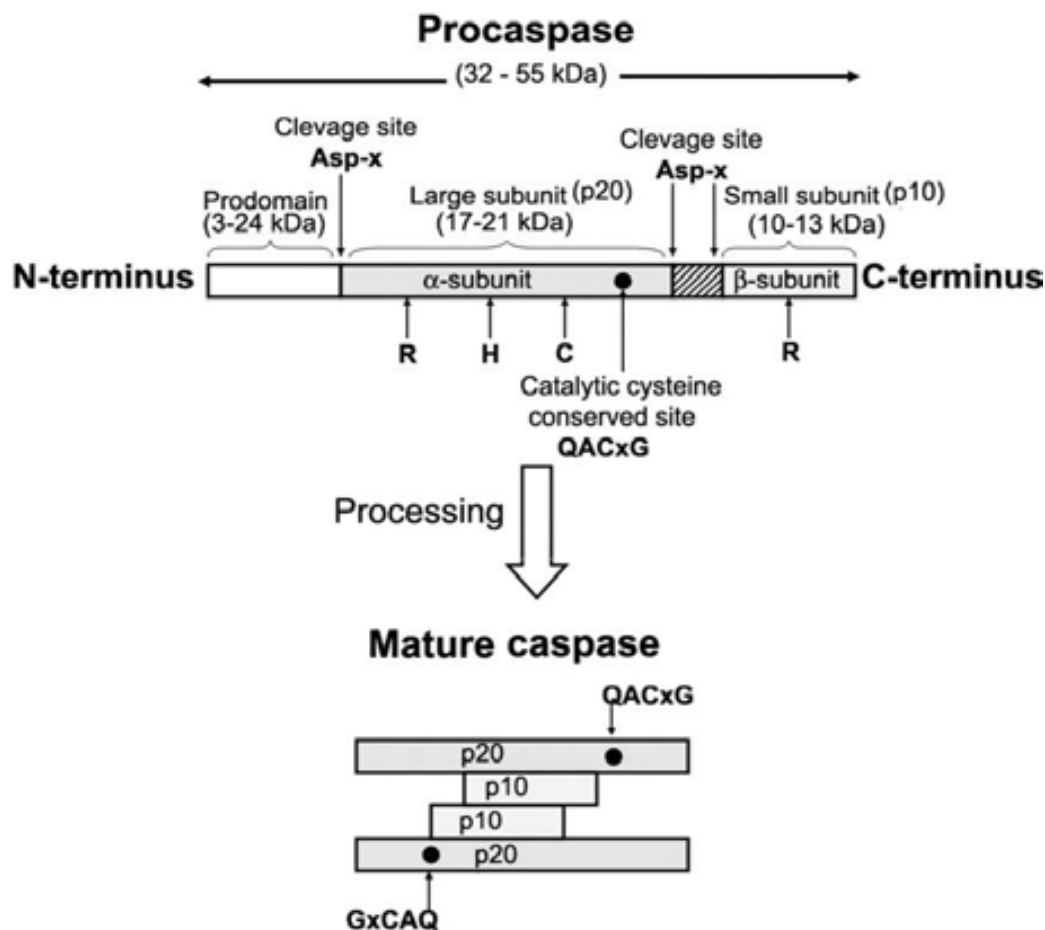
- Presència d'una díada catalítica dels residus Cys-His, que consisteix en un lloc actiu Cys-285 (que forma part de la seqüència pentapeptídica conservada QACXG), i una His-237 (numeració en caspasa-1 humana) (Stennicke and Salvesen 1999).
- Especificitat pel processament dels seus substrats en un residu Asp.
- Els zimògens (pro-caspases) d'aproximadament 32-55kDa, estructuralment consten de (Figura 17):
  - un pro-domini N-terminal (entre 3 i 24 kDa),
  - una subunitat llarga (d'uns 17 a 21 kDa, generalment anomenada p20) que conté el lloc actiu cisteïna, i
  - una subunitat petita c-terminal (d'uns 10 a 13 kDa, generalment anomenada p10).

En algunes pro-caspases, la subunitat llarga i la petita es troben separades per una seqüència curta d'unió.

- L'activació del zimògen està mediada per una sèrie de talls que primer separen la subunitat llarga de la curta seguit del processament del pro-domini.

Les caspases presenten similituds estructurals que suggereixen l'existència d'un origen evolutiu comú per a tots els dominis de reclutament de les caspases. En realitzar els alineaments de les subunitats llarga i petita de les diferents caspases, es va observar que existeixen 29 residus idèntics en al menys 10 membres de la família, dels quals, 7 aminoàcids juguen un paper clau en el reconeixement del substrat i la catàlisi (Hofmann 1999).

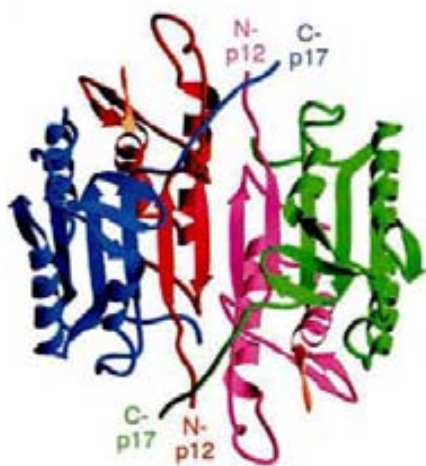
Els tres dominis de les caspases poden alliberar-se del pro-enzim quan es produeix un tall entre un residu aspàrtic (P1) i un altre residu petit i sense càrrega situat més carboxi-terminal (P1') (per exemple glicina, alanina o serina). La seva activitat es troba regulada pel lloc actiu cisteïna dins un motiu conservat QACXG (on X és Q per les caspases-8 i -10, G per la caspasa-9 i R per la resta de caspases conegudes), mitjançant el qual les caspases són capaces de processar els seus substrats en residus aspàrtics específics (Thornberry 1998).



**Figura 17.** Representació esquemàtica de l'estructura d'una pro-caspasa i de l'enzim actiu. El tall de la pro-caspasa en residus aspàrtics específics genera la formació de la caspasa madura, que consisteix en un heterotetràmer p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub> que no conté el pro-domini. C, H i R representen els residus actius. (Modificat de (Chowdhury, Tharakan *et al.* 2008)).

Els estudis cristal·logràfics de l'estructura de les caspases indiquen que la forma activa d'aquestes proteases consisteix en tetràmers [p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub>], que

resulten de l'homodimerització de dos heterodímers constituïts per la subunitat llarga i curta (Figura I7 i Figura I8) (Rotonda, Nicholson *et al.* 1996, Thornberry 1998). Les subunitats de cada heterodímer [p20-p10] estan constituïdes per interaccions hidrofòbiques, de manera que es pleguen en un cilindre compacte amb sis fulles  $\beta$  antiparal·leles centrals. La interacció entre dos homodímers es produeix a través de 12 fulles  $\beta$  que es troben rodejades per 5 hèlix  $\alpha$  distribuïdes en cares oposades del pla format per les fulles  $\beta$  (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). En el tetràmer que forma la caspasa activa, dos heterodímers s'alineen en una configuració "cap-i-cua", situant els dos llocs actius en extrems oposats de la molècula, gràcies a la interacció entre la part més carboxi-terminal de la subunitat llarga d'un dels heterodímers i l'extrem amino-terminal de la subunitat petita de l'heterodímer oposat (Figura I8). Aquesta configuració en tetràmer, i més concretament, la orientació de les subunitats individuals, suggereix un mecanisme d'activació de la proteasa propiciat per la proximitat entre l'extrem C-terminal de la subunitat llarga d'un heterodímer i l'extrem N-terminal de la subunitat petita de l'heterodímer oposat. Mentre que el lloc actiu de la cisteïna es localitza a la subunitat llarga, certs residus cisteïna i glicina presents en la subunitat petita estableixen, mitjançant ponts d'hidrogen, l'estat de transició cap a la formació del tetràmer actiu (Wilson, Black *et al.* 1994).



**Figura I8. Estructura 3D de l'heterotetràmer de caspasa-3.** El tetràmer està compost de dos dominis catalítics heterodimèrics. S'indiquen els extrems N- i C-terminal de les subunitats llarga i petita. (Modificat de (Lavrik, Golks *et al.* 2005)).

## 5.2. Especificitat de substrat i selectivitat

Com s'ha mencionat anteriorment, les caspases reconeixen una seqüència tetrapeptídica específica present en les proteïnes diana. De la mateixa manera que altres proteases de cisteïna, les caspases contenen una parella

catalítica Cys-His on la cisteïna actua de residu nucleòfil i la histidina actua com la base general que, abans de la unió amb el substrat, extraurà el protó tiòlic de la cisteïna catalítica per promoure la seva acció nucleòfila (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Els estudis realitzats a partir de l'estructura cristal·logràfica de diferents membres de la família caspasa, així com estudis on es van utilitzar pèptids sintètics i llibreries peptídiques, han permès establir que els llocs d'unió als substrats són similars en totes les caspases. S'han descrit quatre llocs d'unió principals: S1, S2, S3 i S4. Tot i que tant la subunitat llarga com la petita aporten residus aminoacídics als llocs d'unió del substrat S1-S4, els determinants principals que defineixen l'especificitat de substrat de les caspases es troben localitzats a la subunitat petita (Nicholson 1999). A més de requerir un residu Asp a la posició P1 del substrat (Stennicke, Renatus *et al.* 2000), les caspases són també selectives en el reconeixement dels tres residus situats a l'extrem amino de l'Asp. Per exemple, el lloc d'unió S3 de la caspasa, interactua amb el carboxilat d'un glutamat ubicat en la posició 3 del substrat (P3). De totes maneres, la necessitat de que aquestes tres posicions les ocupin un o diversos aminoàcids en concret, genera un ventall de possibilitats molt més ampli que en el cas de P1. Això es deu a que a diferència dels llocs S2, S3 i S4, el lloc d'unió S1 es troba conservat entre les diferents caspases. L'estructura quaternària que adopta una proteïna susceptible de ser processada per una caspasa, també és de vital importància ja que cal que el lloc de tall (P1-P1') estigui exposat a l'ambient aquós perquè el tetrapèptid pugui ser reconegut (McStay, Salvesen *et al.* 2008).

Una característica pròpia de les pro-caspases consisteix en que poden ser substrats de les pròpies caspases, generant així un circuit d'activacions i amplificacions de senyals (Salvesen and Dixit 1997). També és una característica pròpia de les caspases iniciadores (caspases-8, -9 i -10), que més endavant s'explicaran en detall, que porten el seu propi motiu de reconeixement tetrapeptídic en el lloc de tall entre la subunitat llarga i la petita (Boatright, Renatus *et al.* 2003).

Cal destacar que les caspases, a més de ser altament específiques en el reconeixement del seu substrat i posterior proteòlisi, són molt eficients en el tall. Aquesta especificitat s'evidencia a través de l'absència de digestions proteiques

indiscriminades durant el procés apoptòtic: un grup seleccionat de proteïnes substrat es processa de forma coordinada, generalment en un únic lloc de la seva seqüència aminoacídica, provocant la pèrdua o inclús un canvi en la funció de la molècula processada.

A més, les caspases requereixen un ambient químic reduït amb l'objectiu de mantenir una activitat completa, ja que el grup tiol catalític és extremadament susceptible a la oxidació. Per tant, l'activitat de les caspases quedaria restringida a l'interior cel·lular en el qual l'estat redox tendeix a la reducció, i no a l'exterior cel·lular en el qual existeix una potent activitat oxidativa (Ueda, Nakamura *et al.* 1998, Hentze, Schmitz *et al.* 2002).

En general, les caspases es troben en el citosol en la seva conformació no activa en forma de pro-caspases o zimògens. Una diferència important entre les caspases consisteix en un paràmetre denominat zimogenicitat. Aquest es defineix com la relació d'activitats entre una caspasa en la seva conformació activa i la del zimògen, i indica la major o menor activitat proteasa basal que presenta la pro-caspasa en cada cas, sent més activa quan més proper està aquest paràmetre al valor un (Tachias and Madison 1996). S'ha vist que les pro-caspases-8 i -9 tenen valors de zimogenicitat més propers a la unitat que la pro-caspasa-3, la qual cosa indica que són molt més actives a nivell basal (Salvesen and Dixit 1999) (Taula I1). Així, la zimogenicitat actua com a mecanisme de regulació de l'activitat de les caspases situades al final d'una cascada proteolítica.

caspase	zymogenicity
caspase-3	>10,000
caspase-8	100
caspase-9	10

**Taula I1. Valors de zimogenicitat d'algunes caspases.** Modificat de (Degterev, Boyce et al. 2003).

### 5.3. Classificació

#### ➤ Segons l'especificitat del substrat

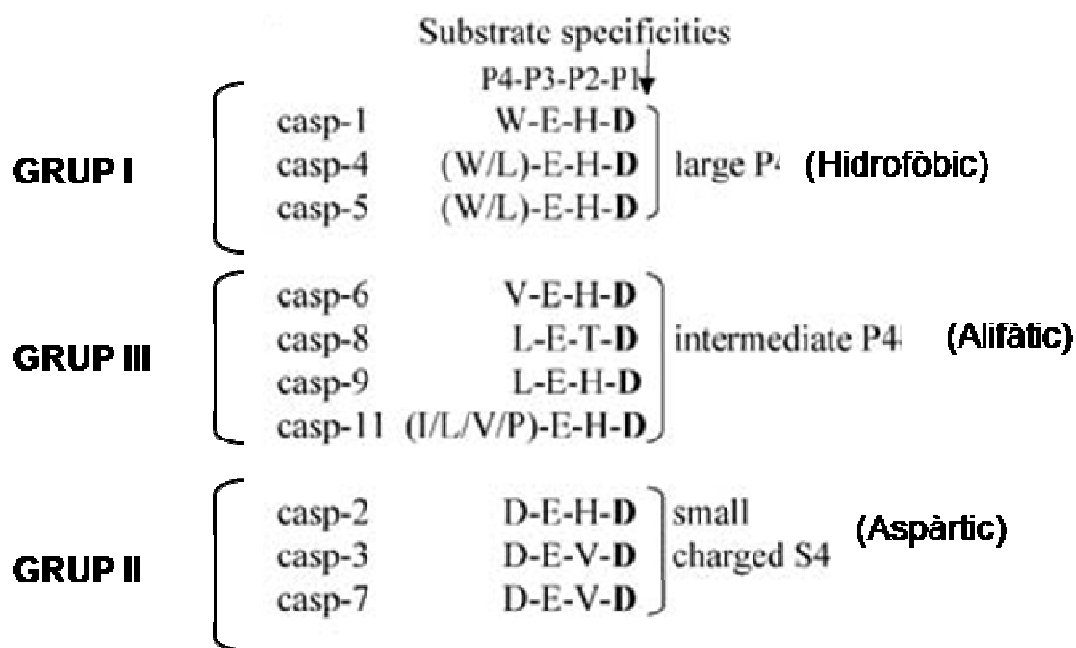
Tot i que totes les caspases presenten especificitat per Asp, s'estableix una preferència en funció de l'aminoàcid que ocupa la posició 4 (P4) en sentit

amino-terminal del substrat, respecte al residu Asp que serà processat. Thornberry i col·laboradors van desenvolupar un mètode d'assaig per determinar l'especificitat de les caspases per diversos substrats *in vitro*, utilitzant pèptids aminometil cumarínics com a substrat (Rano, Timkey *et al.* 1997, Thornberry 1997). En base a això, les caspases humanes es poden dividir en tres grups (Figura I9):

**Grup I**, caspases-1, -4 i -5. Presenten una alta afinitat quan l'aminoàcid que ocupa la posició 4 és hidrofòbic, com per exemple tirosina o triptòfan. L'especificitat del tall per caspases pot ser descrit com  $X^{P4}E^{P3}X^{P2}D^{P1}$ . La seqüència òptima pel grup I seria  $W^{P4}E^{P3}H^{P2}D^{P1}$ .

**Grup II**, caspases-2, -3, -7 i -14. Tenen una activitat màxima quan la posició P4 està ocupada per un Asp. La seqüència aminoacídica preferida per aquest grup de caspases és  $D^{P4}E^{P3}X^{P2}D^{P1}$ .

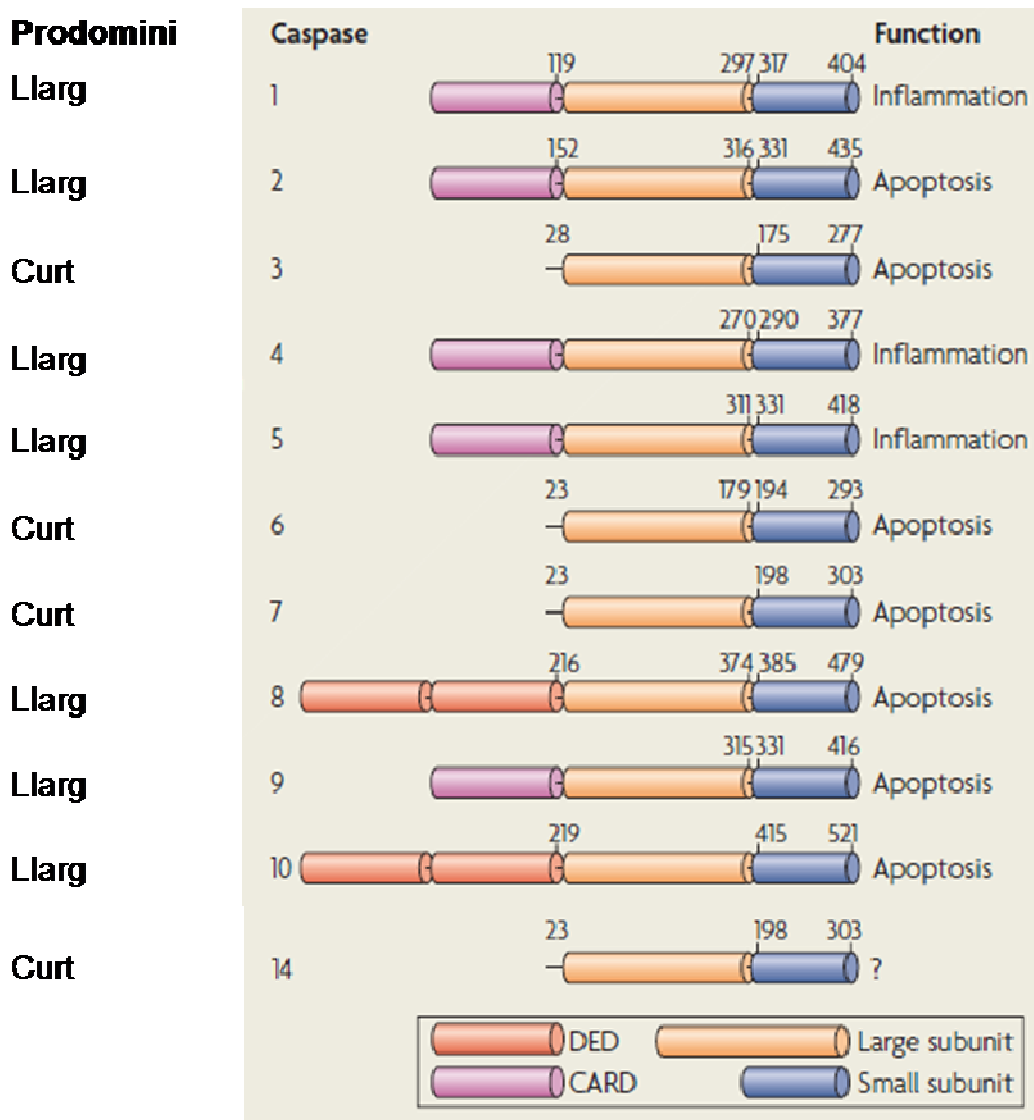
**Grup III**, caspases-6, -8, -9 i -10. Toleren diferents tipus d'aminoàcids en el seu S4, tot i que tenen una preferència clara per aquells aminoàcids ramificats amb cadenes alifàtiques. La seqüència òptima és  $(V, L)^{P4}E^{P3}H^{P2}D^{P1}$ .



**Figura I9. Especificitat proteolítica de les caspases.** Les caspases reconeixen un tetrapèptid situat amino-terminal respecte al lloc de tall. La classificació pot ser realitzada en Grups (I, II i III) o per mida (gran, entremig i petit) de l'aminoàcid en P4 que reconeix la caspasa. La fletxes el lloc de tall per part de les caspases Modificat de (Degterev, Boyce *et al.* 2003).

➤ **Segons la mida del pro-domini**

Les caspases també es poden classificar segons la mida del seu pro-domini. Les caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9 i -10 tenen el pro-domini llarg (> 90 aminoàcids) i les caspases -3, -6, -7 y -14 el tenen curt (entre 20 i 30 aminoàcids) (Figura I10).



**Figura I10. Classificació de les caspases de mamífer segons la longitud del seu pro-domini o la seva funció.** S'indiquen les caspases que tenen un pro-domini llarg (*long*) o curt (*short*), així com els dominis d'interacció amb les proteïnes (DED i CARD). Segons la funció que exerceixen aquestes proteases, es poden classificar de forma general com a pro-apoptòtiques o pro-inflamatòries. Com a excepció a aquesta classificació trobem la caspasa-14 que té com a funció promoure la diferenciació de queratinòcits. (Modificat de (Taylor, Cullen *et al.* 2008)).

Les proteïnes que tenen un pro-domini llarg contenen algun dels dos mòduls d'interacció proteïna-proteïna identificats: DED (de l'anglès, *death effector domain*) o CARD (de l'anglès, *caspase recruitment domain*). Aquests permeten una fina regulació de la seva activació. El DED, present en les caspases -8 i -10, permet la interacció de la caspasa amb proteïnes adaptadores que es troben associades a receptors de membrana, coneguts com a “receptors de mort”. D'altra banda, les caspases -1, -2, -4, -5, -9, que presenten el domini CARD, són capaces de formar complexos macromoleculars intracel·lulars amb altres proteïnes que també tinguin dominis CARD (com per exemple Apaf-1), que actuaran com a plataformes per a la activació d'aquestes proteases (Cryns and Yuan 1998, Martinon and Tschopp 2007). Com a curiositat, s'ha vist que els dos dominis, DED i CARD, es troben presents en la caspasa-15, que ha estat recentment identificada en alguns mamífers (gos i porc) però és absent en els genomes de ratolí i l'humà (Eckhart, Ballaun *et al.* 2005).

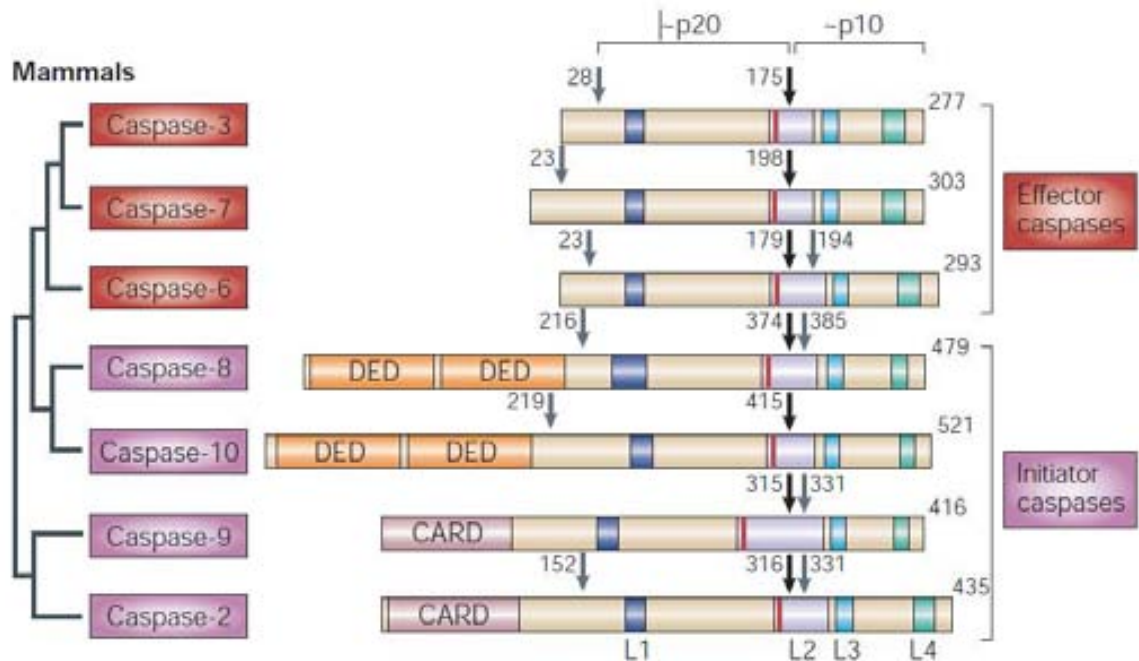
#### ➤ **Segons la funcionalitat**

Durant molt de temps, les caspases s'han classificat funcionalment com a “pro-apoptòtiques” i “pro-inflamatòries” (Figura I11). Avui en dia aquesta classificació segueix vigent però amb matisos, ja que s'ha descrit que la major part dels candidats apoptòtics (caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10) tenen algun tipus de funció en processos no apoptòtics (Bredesen 2008). També s'ha observat que membres típics de la classe pro-inflamatòria com les caspases-1, -4 i -5, poden induir piroptosis, un tipus de mort on s'activen massivament cèl·lules inflamatòries (Labbe and Saleh 2008). A més, com a excepció a aquesta classificació trobem la caspasa-14 que té com a funció promoure la diferenciació de queratinòcits.

Com que la maquinària apoptòtica s'inicia degut a una gran varietat d'estímuls extra- i intracel·lulars, algunes caspases desenvolupen les seves funcions connectant les vies de senyalització inicials amb les vies d'execució de l'apoptosi. Per això, les caspases pro-apoptòtiques es poden dividir en dos grups. Les caspases que estan en vies inicials s'anomenen caspases iniciadores / apicals (caspasa-2, -8, -9, -10). Les que participen en vies més *downstream* de l'apoptosi s'anomenen caspases executores / efectores (caspasa-3, -6, -7) i són les que processen multitud de proteïnes, són



típicament processades i activades per les caspases iniciadores (Figura I11) (Cryns and Yuan 1998). Cal apuntar que les caspases iniciadores tenen un prodomini llarg mentre que les executores el tenen curt (Figura I11).



**Figura I11. Caspases apoptòtiques en mamífers.** Es divideixen en iniciadores i efectores. Les fletxes indiquen els llocs de tall per generar els fragments p10 i p20, aproximadament. L1-4 representa les 4 regions que configuren el centre catalític. El residu de cisteïna catalítica està marcat en vermell a l'inici de la regió L2. Modificat de (Riedl and Shi 2004).

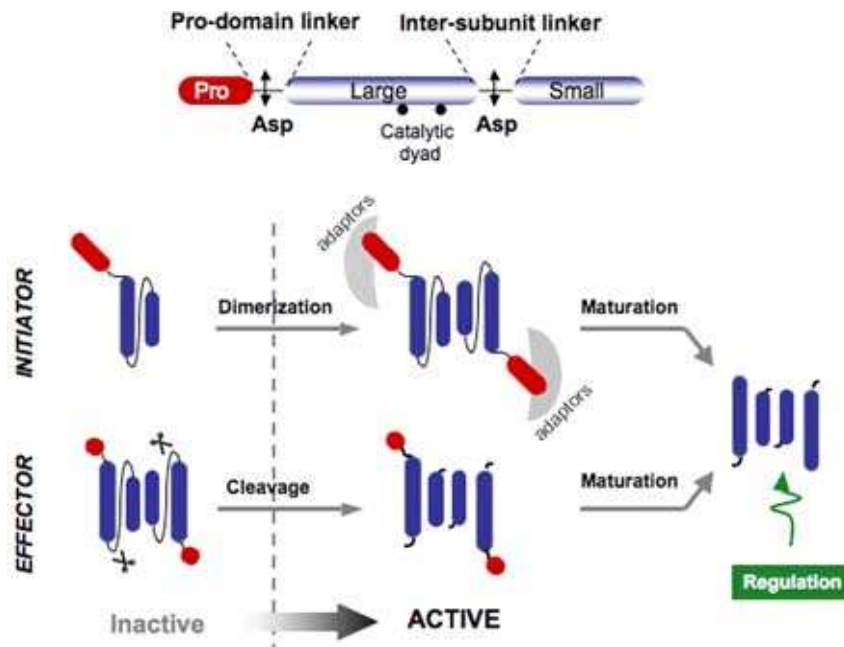
#### 5.4. Mecanismes d'activació de les caspases

La informació estructural disponible de les caspases indica que, en general, tant les conformacions del zimògens com les de les seves formes actives són similars entre les caspases. En canvi, la transició de zimògen a forma activa s'executa a través de mecanismes diferents per a caspases iniciadores o executores.

##### ➤ Caspases iniciadores: activació mitjançant dimerització

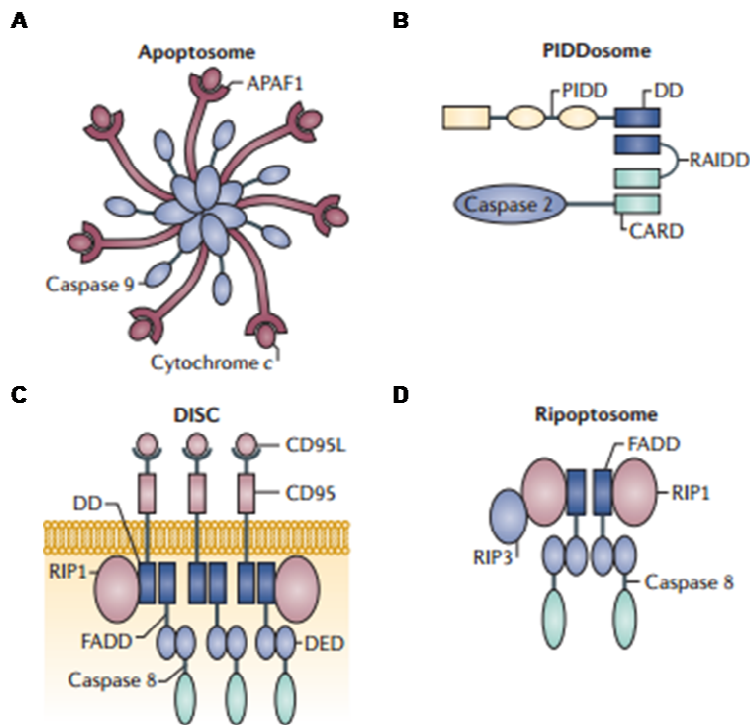
En estat inactiu, les caspases iniciadores es troben com a monòmers inactius que requereixen de la homodimerització per poder-se activar (Figura I12). De forma fisiològica, la dimerització es veu facilitada pel reclutament d'aquestes caspases cap a plataformes oligomèriques d'activació que han sigut

assemblades en resposta a un estímul apoptòtic, a través dels dominis DED o CARD presents en el pro-domini. Aquest reclutament, provoca un augment local en la concentració de la caspasa i, la proximitat de diverses molècules, genera una activitat que promou la dimerització (Riedl and Salvesen 2007).



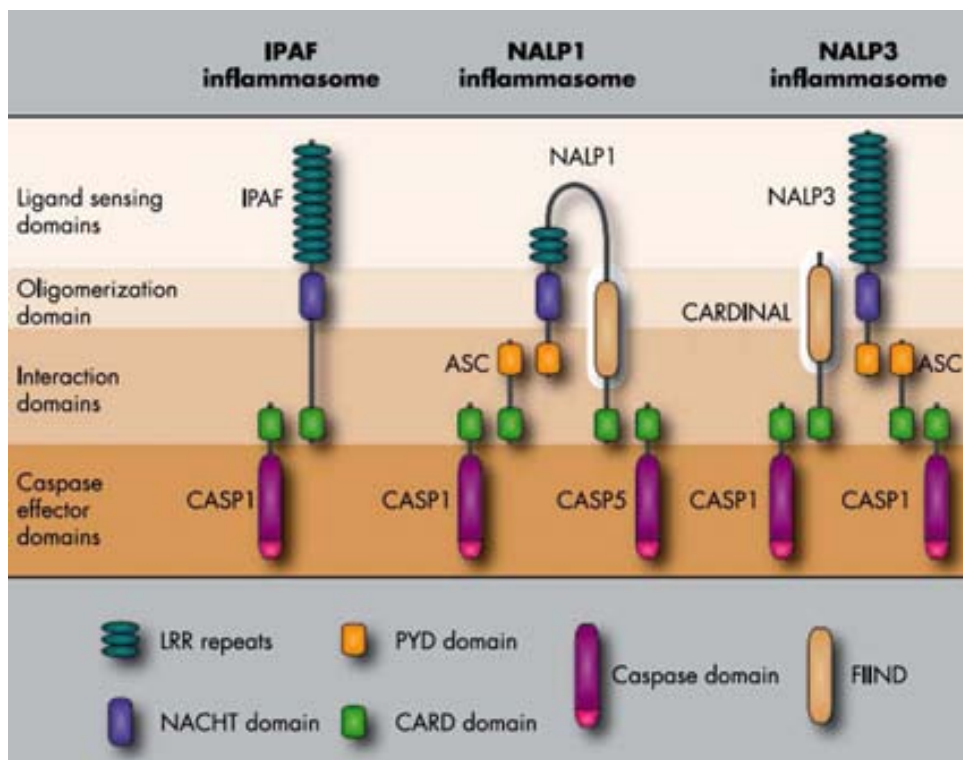
**Figura I12. Mecanismes d'activació de caspases iniciadores i executores.** Les caspases iniciadores es troben en un estat monomèric i s'activen a través de la dimerització mediada pel pro-domini. En canvi, les caspases executores, es troben en forma de dímers i s'activen per la proteòlisi de les regions d'unió entre les subunitats llarga i petita. Una vegada les caspases s'han activat encara sofreixen més talls que condueixen a formes més estables de la proteasa, procés denominat maduració. La caspasa, un cop madura, és sotmesa a processos de regulació. Font: (Pop and Salvesen 2009).

Cada caspasa apical conté la seva pròpia plataforma d'activació: el DISC (de l'anglès, *death inducing signaling complex*) recluta i activa les caspases-8 i / o -10, el ripoptosoma a caspasa-8, l'apoptosoma activa la caspasa-9 i el PIDDossoma promou l'activació de la caspasa-2 (Thomas, Frenz *et al.* 1992) (Figura I13). En alguns casos, algunes proteïnes adaptadores presents en el complex d'activació són capaces de senyalitzar cap a vies completament oposades. Aquest és el cas de la caspasa -2 i -8 que, en determinades circumstàncies, poden activar tant vies de mort com de supervivència cel·lular (Tinel, Janssens *et al.* 2007, Wang, Du *et al.* 2008).



**Figura I13. Complexes de proteïnes adaptadores responsables de l'activació de caspases iniciadores.** L'activació de les caspases en mamífers està induïda per l'apoptosoma (A) (caspasa-9), el PIDDosoma (caspasa-2) (B), el DISC (caspases-8 i -10) (C) i el Ripoptosoma (caspasa-8) (D). Modificat de (Kreuzaler and Watson 2012).

Les caspases pro-inflamatòries s'activen, probablement, mitjançant un mecanisme d'inducció similar al de dimerització descrit. Els complexes d'activació multi proteics són denominats inflammasomes i tenen una alta afinitat pel domini CARD present en les caspases-1, -4 i -5 (Figura I14).

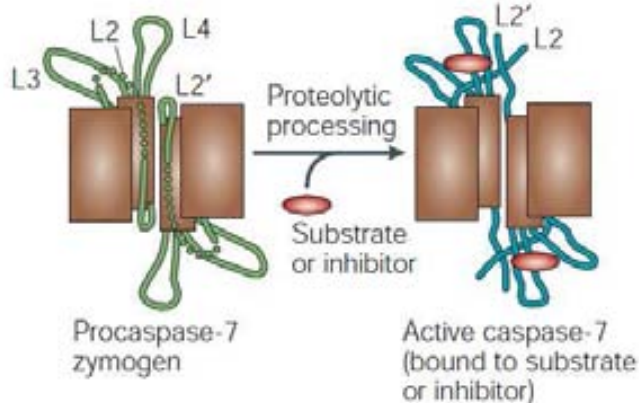


**Figura I14. Complexes d'activació de les caspases pro-inflamatòries: inflamosomes.** Els receptors NLRs (de l'anglès, *NOD-like receptors*) tenen tres dominis estructurals: el domini LRR (de l'anglès, *leucine-rich repeat*) C-terminal, l'intermediari NACHT (de l'anglès, *NTPases implicated in apoptosis and multihisto-compatibility complex*) i el N-terminal que pot ser un domini pirina (PYD, de l'anglès, *pyrine domain*), CARD o BIR (de l'anglès, *baculovirus Inhibitor-of-apoptosis protein repeat domain*). El domini LRR s'encarrega de sensar el lligant de manera que es troba involucrat en la interacció amb PAMPs (de l'anglès, *Pathogen-associated molecular patterns*). El domini NACHT és responsable de la oligomerització i activació de NLRs. El domini PYD o CARD constitueixen el nexa amb proteïnes adaptadores com ara ASC (de l'anglès, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). Durant l'activació de l'inflamasoma, NALP3 (de l'anglès, *Nacht leucine-rich repeat protein*) i NALP1 interaccionen amb ASC, a través del domini PYD, provocant la seva activació. Un cop actiu, ASC induïx l'activació de caspasa-1 mitjançant el domini CARD. Cal destacar que NALP1 és, al seu torn, capaç d'activar directament a caspasa-5 mitjançant el seu domini CARD C-terminal. En canvi, NALP3 pot reclutar una segona molècula de caspasa-1, a través del seu component CARDINAL (de l'anglès, *CARD Inhibitor of nuclear factor kB activating ligand*). De gran interès és el fet que el inflamasoma IPAF (de l'anglès, *interleukin 1B-converting enzyme (ICE)-protease activating factor*) conté un domini CARD N-terminal que li permet activar directament a caspasa-1, sense la necessitat de reclutar la proteïna ASC. Font: (Sidiropoulos, Goulielmos *et al.* 2008).

Tot i així, no està del tot clar si el mecanisme d'activació de les caspases pro-inflamatòries es produeix a través de la homodimerització o si és el resultat de la heterodimerització amb altres components de l'inflamasoma, com seria el cas de caspasa-1 que heterodimeritza amb caspasa-5 en l'heterocomplex caspasa-8 amb FLIP (Boatright, Deis *et al.* 2004).

### ➤ **Caspases executores: activació per processament**

Les caspases executores existeixen com a dímers inactius i necessiten el processament entre la subunitat p20 i la subunitat p10 per a esdevenir actives. La dimerització ocorre immediatament després de la síntesi del zimògen però es mantenen inactives a través de la seqüència d'unió que separa les subunitats llarga i petita del domini catalític. El processament proteolític d'aquesta seqüència d'unió permet la reordenació de llaços mòbils afavorint la formació del centre catalític (Figura I12 i Figura I15).



**Figura 115. Mecanismes moleculars d'activació de la pro-caspasa-7.** Representació esquemàtica dels llaços del lloc actiu abans (verd) i després (blau) del processament proteolític. Modificat de (Riedl and Shi 2004).

### ➤ Maduració proteolítica

El procés de maduració consisteix a establir la caspasa o promoure esdeveniments reguladors específics que condueixen a la mort de la cèl·lula. Posteriorment a la dimerització, el procés d'activació de les caspases continua amb talls auto-proteolítics en el que anomenaríem esdeveniments de maduració, donant lloc a la generació de neo-epítops. La maduració resulta ser opcional i és un esdeveniment cronològicament diferent que no ha de ser confós amb el procés d'activació. La maduració involucra la separació del pro-domini o el processament de la seqüència d'unió entre les subunitats llarga i petita de la caspasa. A causa de la generació de neo-epítops, la maduració de les caspases comporta diferents conseqüències a nivell cel·lular. Com a exemple, la dimerització de caspasa-8 en absència de maduració produeix una forma activa capaç de senyalitzar proliferació i activació de limfòcits T sense provocar la mort cel·lular, la qual requereix d'una caspasa-8 completament processada (Kang, Oh *et al.* 2008). A nivell mecànic, aquest auto-processament (maduració) estableix el domini catalític de caspasa-8 permetent que aquesta proteasa sigui capaç de mantenir la seva activitat en el citosol un cop alliberada del DISC (Pop, Fitzgerald *et al.* 2007). Tot i això, no es coneix amb certesa si la simple estabilització mitjançant maduració explicaria les funcions oposades de caspasa-8 que s'acaben d'esmentar. En el cas de caspasa-9, el procés de maduració implica el processament de la seqüència d'unió entre les dues subunitats. Aquest processament és realitzat per caspasa-3 i determina l'exposició de nous epítops requerits per a la regulació de caspasa-9 a través de

la unió d'una proteïna inhibidora coneguda com XIAP i que es descriurà més endavant (Srinivasula, Hegde *et al.* 2001).

### 5.5. Substrats de caspases a nivell cel·lular

És important remarcar alguns dels conceptes bàsics que ja s'han mencionat alhora d'examinar el rol de les caspases en l'execució de l'apoptosi. En primer lloc, les caspases no degraden altres proteïnes. Donat que el reconeixement del substrat és estrictament específic, les caspases processen els seus substrats en un o en pocs llocs altament selectius. Segon, tot i que les caspases tallen algunes proteïnes estructurals requerides pel manteniment de l'estructura cel·lular, freqüentment tallen proteïnes de senyalització com les quinases. Això comporta l'activació o supressió de determinades vies de senyalització que executaran la mort cel·lular. Així doncs, les caspases són molècules de senyalització que orquestren l'activació de les vies de senyalització *downstream*. En certa manera, les caspases es comporten de forma anàloga a les quinases, amb l'excepció que els canvis que les caspases fan en els seus substrats són irreversibles, així com ho és la decisió d'una cèl·lula d'entrar en apoptosi (Degterev, Boyce *et al.* 2003).

Al 1998, el grup de Schulze-Osthoff va publicar una llista amb 65 substrats que es podien classificar en uns pocs grups funcionals:

- Proteïnes estructurals de citoplasma i nucli
- Proteïnes involucrades en transducció de senyals i reguladores de la transcripció
- Proteïnes controladores del cicle cel·lular
- Proteïnes involucrades en replicació i reparació del DNA

Des de llavors, el nombre de substrats coneguts ha anat augmentant. Així, el mateix grup va publicar al 2003 la identificació de més de 280 substrats ordenats en una nova classificació més complexa en la qual es classifiquen les proteïnes en 22 grups segons la seva funció (Fischer, Janicke *et al.* 2003): 1. Reguladors de l'apoptosi; 2. Adhesió cel·lular; 3. Estructurals i de citoesquelet; 4. Nuclears i proteïnes abundants; 5. Proteïnes del Reticle endoplasmàtic i residents de Golgi; 6. Cicle cel·lular; 7. Síntesi, tall i reparació del ADN; 8. Unió al

DNA i factors de transcripció; 9. Síntesi i splicing de l'ARN; 10. Traducció protèica; 11. Citoquines; 12. Receptors de membrana; 13. Proteïnes adaptadores; 14. Tirosin kinases; 15. *Ser/Thr-Protein kinases* de transducció de senyal; 16. Fosfatases; 16. Modificació de proteïnes; 17. Degradació de proteïnes; 18. Proteïnes G de senyalització; 19. Calci, c-AMP, c-GMP i metabolisme de lípids; 20. Neurodegeneració; 21. Proteïnes virals; 22. Altres substrats

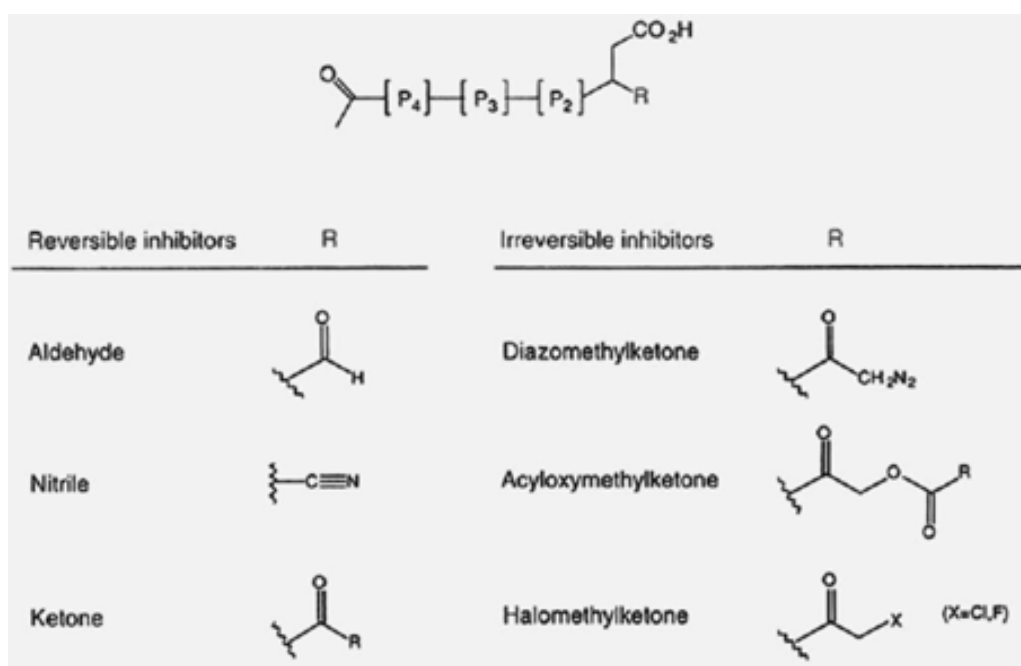
La rellevància del descobriment dels substrats de caspases recau en la comprensió del procés apoptòtic en sí, en poder relacionar els talls específics generats per caspases amb el fenotip apoptòtic observat. No obstant això, és poc probable que tots els substrats de caspases tinguin una funció igualment rellevant en aquest procés. Donada l'existència d'una àmplia llista dels substrats de caspases en continu creixement, al 2007 es va crear una base de dades en línia denominada CASBAH (de l'anglès, *caspase substrate database homepage*) que conté tots els substrats de caspases de mamífers que han estat reportats (<http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/>) i inclou els llocs de tall d'aquestes proteases (Luthi and Martin 2007). A més, recentment s'han desenvolupat mètodes informàtics que prediuen llocs, tant clàssics com atípics, plausibles de ser processats per les caspases en múltiples proteïnes (Piippo, Lietzen *et al.* 2010, Song, Tan *et al.* 2010).

## 5.6. Inhibidors químics de les caspases

Els inhibidors de caspases són vitals per a l'estudi, comprensió i enteniment del mecanisme de mort apoptòtica. Atès que les caspases són cisteïna proteases, qualsevol inhibidor que pugui interaccionar amb el lloc catalític cisteïna serà capaç d'inhibir aquestes proteases. S'ha vist que alguns d'aquests compostos són efectius en diversos models animals de malalties, com per exemple, en accidents cervell-vasculars, isquèmia, determinades patologies hepàtiques i traumatisme craneoencefàlic (Yakovlev, Knoblach *et al.* 1997, Yaoita, Ogawa *et al.* 1998).

L'estratègia per al disseny d'inhibidors de caspases es basa en el motiu de reconeixement tetrapeptídic d'aquestes proteases i, a més, han estat

dissenyats amb modificacions en la porció C-terminal amb la finalitat d'obtenir antagonistes tant reversibles com irreversibles (Degterev, Boyce *et al.* 2003). S'han generat diferents tipus de pèptids inhibidors entre els quals trobem els constituïts per un sol residu aspàrtic (Boc-Asp-FMK), per dipèptids (Q-Val-Asp-OPH), per tripèptids (Boc-Val-Ala-Asp-FMK), per tetrapèptids (Z-Tyr-Val-Ala-Asp-FMK) i fins i tot per pentapèptids (Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-FMK). Entre els inhibidors reversibles trobem aldehids (-CHO), nitrils (-CN) i cetones (-COR), els quals actuen com pseudo-substrats de caspases actives però sense alterar-les químicament (Ekert, Silke *et al.* 1999), és a dir, que actuen com a inhibidors competitiu formant enllaços covalents amb la cisteïna catalítica que són ràpidament hidrolitzats. D'altra banda, els exemples d'inhibidors de caspasa irreversibles inclouen diazometilcetones (-N<sub>2</sub>), aciloximetilcetones (-OCOR) i halometilcetones (-Cl,-F) (Ekert, Silke *et al.* 1999) (Figura I16).



**Figura I16. Classificació dels inhibidors químics de caspases.** Font (Thornberry 1998).

S'ha proposat que els inhibidors irreversibles s'uneixen a través d'un enllaç tioèster a l'estat de transició oxanió i l'oxigen del carbonil ocupa un "buit oxanió" en l'estat de transició de la caspasa (Mittl, Di Marco *et al.* 1997, Walker, Leblanc *et al.* 1999). Com s'ha dit anteriorment, existeixen inhibidors de



caspases que presenten un motiu de reconeixement tetrapeptídic corresponent a la seva especificitat de substrat, i que li confereix l'habilitat d'unir-se i inhibir a caspases específiques. D'aquesta manera, l'acció de caspases iniciadores i executores és suprimida per molècules aldehyd que presenten com a tetrapèptid Ac-IETD-CHO i Ac-DEVD-CHO, respectivament, mentre que les caspases pro-inflamatòries són inhibides per Ac-WEHD-CHO (Garcia-Calvo, Peterson *et al.* 1998). Els pèptids inhibidors mostren un ampli rang d'especificitat i potència contra l'activitat caspassa, amb constants de dissociació que van des concentracions picomolars fins a micromolars (Callus and Vaux 2007). La major part aquests inhibidors sintètics de caspases són hidrofòbics. Uns desventatja és que en ser utilitzats a concentracions requerides per inhibir les caspases intracel·lulars són capaços de causar efectes tòxics inespecífics. S'ha descrit que l'addició d'un grup O-fenoxi en la porció C-terminal, juntament amb un grup quinolil N-terminal, millora de manera significativa l'eficàcia del pèptid. Per exemple, l'inhibidor quinolil-valil-O-metilaspartil-[2,6-difluorofenoxi]-metilcetona (Q-VD-OPh), inhibeix efectivament l'activitat caspassa utilitzant una desena part de la dosi requerida per part de Boc-D-FMK (Caserta, Smith *et al.* 2003). A més, el grup O-fenoxi fa que aquest inhibidor sigui més reactiu amb la cisteïna activa de les caspases, proporcionant l'explicació de l'augment d'efectivitat del Q-VD-OPh respecte als inhibidors conjugats amb fluorometilcetona. Així mateix, el grup quinolil N-terminal, per si sol, disminueix la dosi requerida del pèptid inhibidor per exercir la seva acció a través d'un augment en la permeabilitat cel·lular. Aquest pèptid, està classificat com un inhibidor d'ampli espectre de l'activitat enzimàtica de caspases, competitiu i irreversible. Un altre inhibidor d'ampli espectre també utilitzat de forma habitual, és l'anomenat z-VAD-FMK, però a diferència del Q-VD-OPh, a més d'inhibir caspases, aquest pèptid és capaç d'inhibir calpaïnes i catepsines. Això pot ser degut a que les halometilcetones són molècules molt més reactives que els derivats aldehyds, de manera que poden no ser específiques per les caspases i, per tant, inhibir altres cisteïna proteases com les anteriorment esmentades (Ekert, Silke *et al.* 1999). Així doncs, la principal desavantatge dels antagonistes de caspases es troba representada per la modesta selectivitat reportada i la baixa especificitat, ja que els és difícil discriminar entre els diferents membres de la família de les caspases (Degterev, Boyce *et al.* 2003, Pereira and Song 2008).

## 5.7. Models genètics murins d'estudi de la funcionalitat de les caspases

Les evidències que existeixen a favor de la implicació de les caspases en la regulació i execució del procés apoptòtic són diverses (Cryns and Yuan 1998). Malgrat això, les més concloents respecte a la seva funció provenen d'estudis en els quals aquests gens han estat eliminats en models murins. Els ratolins que presenten els defectes més rellevants relacionats amb el procés apoptòtic són els deficientes per caspasa-3 (veure Taula I2). Aquests, mostren àrees del sistema nerviós en què hi ha un increment del nombre de cèl·lules a causa del dèficit en el procés de mort que ocorre de forma fisiològica en el sistema nerviós. Malgrat això, hi ha casos en els quals s'han eliminat altres caspases sense observar canvis en el fenotip del ratolí. Aquest fet podria atribuir-se a una compensació en la funcionalitat de les proteases.

**Taula I2. Fenotips apoptòtics i no-apoptòtics trobats en els ratolins deficientes (*Knockout*) per les diferents caspases.** Font: (Li and Yuan 2008).

<i>Genotype</i>	<i>Apoptotic phenotype</i>	<i>Non-apoptotic phenotype</i>	<i>Reference</i>
Caspase-1 <sup>-/-</sup>	Viable. No defects in developmental cell death	Defects in pro-IL-1 $\beta$ and pro-IL-18 processing. Resistant to LPS-induced septic shock	Kuida <i>et al.</i> (1995) and Li <i>et al.</i> (1995)
Caspase-2 <sup>-/-</sup>	Viable. No defects in developmental cell death except excess germ cells in the ovary of female mutants. Mutant oocytes and neurons show resistance to apoptosis <i>in vitro</i>	Fewer facial motor neurons at birth, which become normal by postnatal day 7	Bergeron <i>et al.</i> (1998) and Troy <i>et al.</i> (2000)
Caspase-3 <sup>-/-</sup>	Most mutants die postnatally in mixed 129/SvJ and C57BL/6 background but are viable in C57BL/6 background. Decreased apoptosis in brain		Kuida <i>et al.</i> (1996)
Caspase-7 <sup>-/-</sup>	Viable. Mutant MEFs show mild resistance to apoptosis		Lakhani <i>et al.</i> (2006)
Caspase-3 <sup>-/-</sup> and caspase-7 <sup>-/-</sup>	DKO die perinatally. About 10% DKO embryos displayed exencephaly. DKO MEFs are resistant to apoptosis	Dilation of the atria and disorganization of the ventricular musculature	Lakhani <i>et al.</i> (2006)
Caspase-8 <sup>-/-</sup>	Prenatally lethal. Mutant MEFs are resistant to death receptor-mediated apoptosis	Impaired heart muscle development and congested accumulation of erythrocytes. Degeneration of yolk sac vasculature and circulatory failure. Defective hematopoietic progenitor function and macrophage differentiation	Kang <i>et al.</i> (2004) and Varfolomeev <i>et al.</i> (1998)
Caspase-9 <sup>-/-</sup>	Die perinatally. Defective brain development associated with decreased apoptosis. Mutant MEFs are resistant to apoptosis		Hakem <i>et al.</i> (1998) and Kuida <i>et al.</i> (1998)
Caspase-11 <sup>-/-</sup>	Viable. Defects in apoptosis induced by LPS and ischemic brain injury	Defects in IL-1 production. Resistant to LPS-induced septic shock. Reduced leukocyte motility	Kang <i>et al.</i> (2000), Li <i>et al.</i> (2007) and Wang <i>et al.</i> (1998)
Caspase-12 <sup>-/-</sup>	Viable. Reduced ER stress induced apoptosis	Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance	Nakagawa <i>et al.</i> (2000) and Saleh <i>et al.</i> (2006)
Caspase-14 <sup>-/-</sup>		Defects in profilaggrin processing and skin epidermal barrier formation. Skin dehydration and sensitive to UV radiation	Denecker <i>et al.</i> (2007)

Abbreviations: DKO, double knockout; ER, endoplasmic reticulum; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharides; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; UV, ultraviolet.

## 6. Vies de regulació de l'apoptosi

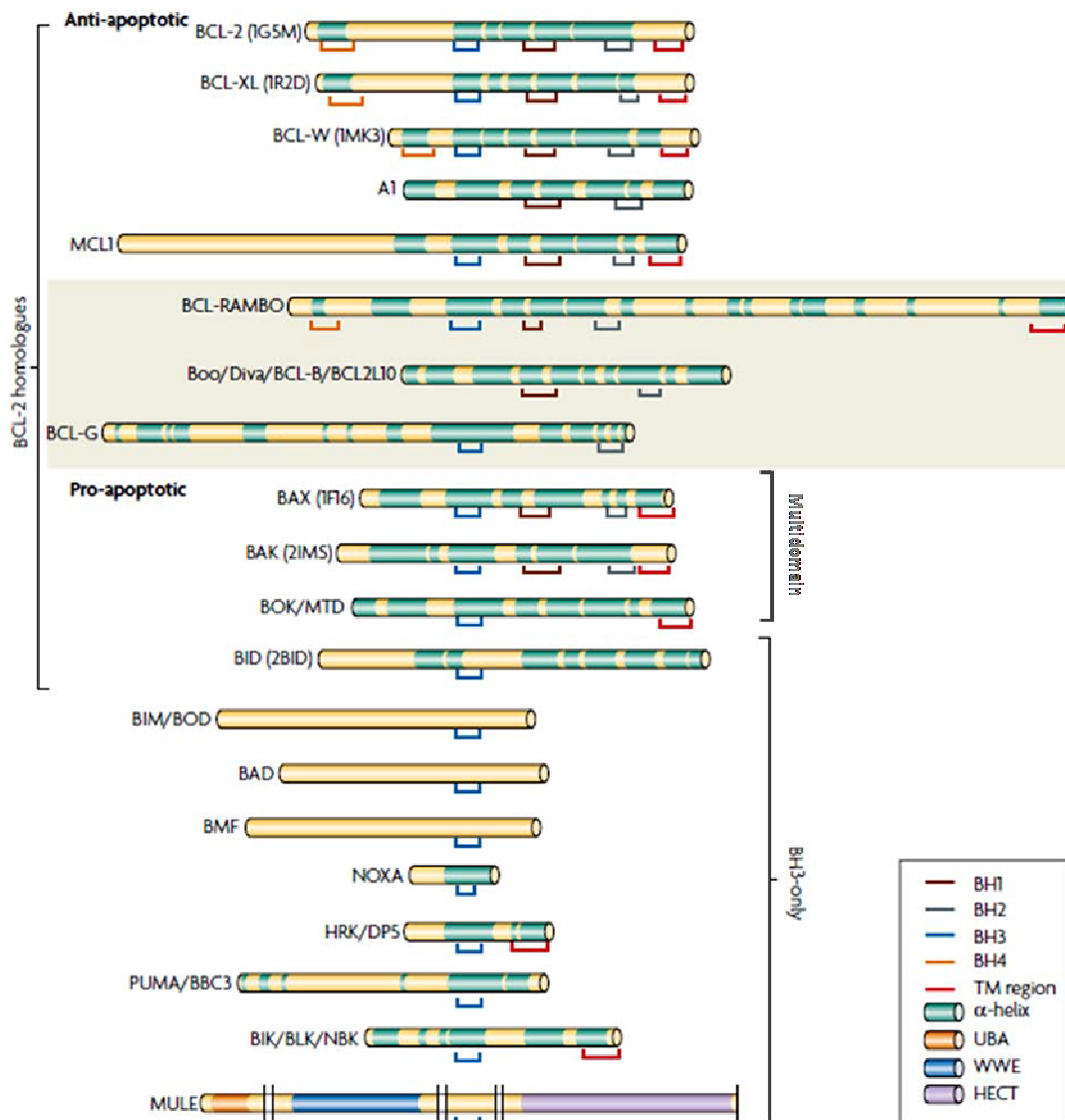
### 6.1. Proteïnes de la família de Bcl-2

Com s'ha esmentat prèviament, un altre dels gens essencials en la regulació del procés apoptòtic en *C. elegans* és CED-9, del qual la proteïna homòloga en mamífer va resultar ser Bcl-2 (de l'anglès, *B-cell lymphoma-2 protein*) (Hengartner and Horvitz 1994). Es va veure que ratolins transgènics creats per expressar de manera forçada el gen *bcl-2*, desenvolupaven una expansió policlonal d'una població de cèl·lules B madures detingudes en fase G0/G1 del cicle cel·lular (McDonnell, Deane *et al.* 1989). Aquest fenomen es devia a un augment de la supervivència cel·lular com a conseqüència de la supressió de mort cel·lular apoptòtica per part de Bcl-2 (Vaux, Cory *et al.* 1988, Hockenbery, Nunez *et al.* 1990). Posteriorment, es van identificar una sèrie de gens que eren capaços de regular la mort cel·lular, que exhibien una gran similitud de seqüència amb Bcl-2 i que van ser agrupats en l'anomenada "família de Bcl-2". Els membres d'aquesta família són classificats funcionalment en dos grups: anti-apoptòtics o pro-apoptòtics. La regulació de les seves interaccions determina la supervivència o el compromís a morir per part de la cèl·lula (veure figura 117).

El primer grup inclou les proteïnes amb activitat anti-apoptòtica Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (de l'anglès, *B-cell lymphoma-extra large*), Bcl-w (de l'anglès, *B-cell lymphoma-w*), Bfl-1/A1 (de l'anglès, *BCL-2-related general A1*), Mcl-1 (de l'anglès, *myeloid cell Leukemia 1*) i Boo (*Bcl-2 homolog of ovary*) també conegut com Diva. Totes elles, excepte Bfl-1/A1 i Mcl-1, es caracteritzen per posseir quatre dominis conservats coneguts com a BH (de l'anglès, *Bcl-2 homology*, de BH1 fins BH4). Es localitzen principalment a través de la seva regió C-terminal a la membrana mitocondrial externa, tot i que també els podem trobar en el citosol, a la membrana del reticle endoplasmàtic i en l'envolcall nuclear (Huang, Cory *et al.* 1997, Adams and Cory 1998, Chipuk and Green 2008). S'ha proposat que la seva funció anti-apoptòtica resideix en el domini BH4 (Huang, Adams *et al.* 1998), tot i que Mcl-1 i A1/Bfl-1, que no tenen aquest domini, són capaços d'unir-se a les proteïnes *BH3-only* i exercir el seu efecte anti-apoptòtic (Hossini and

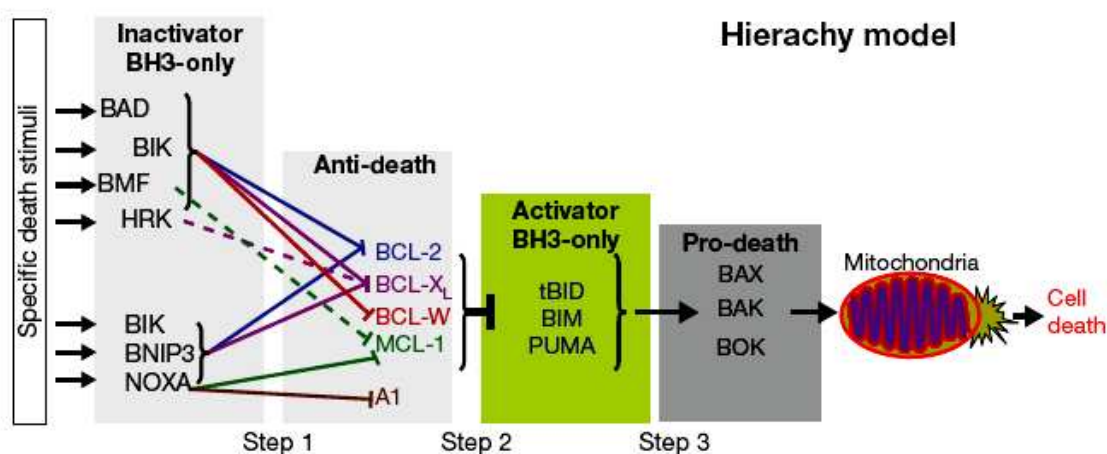
Eberle 2008). La funció principal d'aquests membres anti-apotòtics de la família de Bcl-2 és la de preservar la integritat de la membrana mitocondrial externa, evitant així la sortida de factors pro-apoptogènics de la mitocondria (com per exemple citocrom c) impedit la cascada apoptòtica (Hengartner 2000, Vaux 2011). Això es porta a terme a través de la inhibició directa de les proteïnes pro-apoptòtiques de la família de Bcl-2.

El segon grup, està format per proteïnes pro-apoptòtiques que estan dividides en les pro-apoptòtiques multidomini i les pro-apoptòtiques *BH3-only*. Dins de les pro-apoptòtiques multidomini trobem: Bax (de l'anglès, *Bcl-2-associated protein*), Bak (de l'anglès, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) i Bok (de l'anglès, *Bcl-2 related ovarian killer*). Al principi, es creia que aquestes proteïnes estaven constituïdes per tres dels quatre dominis BH: BH1, BH2 i BH3 (Suzuki, Youle *et al.* 2000), però l'alineament de les proteïnes globulars de la família Bcl-2 va revelar l'existència d'un motiu BH4-like conservat (Kvansakul, Yang *et al.* 2008). La seva acció pro-apoptòtica s'exerceix a través de la formació de porus a la membrana mitocondrial externa mitjançant l'oligomerització de Bak i Bax (Danial and Korsmeyer 2004), desestabilitzant la membrana mitocondrial externa i provocant l'alliberament de factors que finalment conduiran a l'activació de caspases executores (Wang 2001). De fet, cèl·lules extrems de ratolins deficientes en Bax i Bak no poden permeabilitzar la membrana externa mitocondrial després d'una gran varietat d'estímuls apoptòtics (Wei, Zong *et al.* 2001). Dins de les proteïnes pro-apoptòtiques, trobem els diferents membres *BH3-only*, anomenats així ja que únicament presenten el domini BH3 que els confereix el comportament pro-apoptòtic. Aquest grup inclou les proteïnes Bid (de l'anglès, *BH3-interacting domain death agonist*), Bim (Bcl-2L11, de l'anglès *Bcl-2 like 11*), Bad (de l'anglès, *Bcl-2 associated death promoter*), Bmf (de l'anglès, *Bcl-2 modifying factor*), Noxa (sinònim de PMAIP1, de l'anglès *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), Hrk/Dps (Harakiri), Puma (de l'anglès, *p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bik (de l'anglès, *Bcl-2 interacting killer*), Mule i BNIP3 (de l'anglès, *BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3*) (Huang and Strasser 2000).



**Figura I17. Alineament de la seqüència del core dels membres de la família de Bcl-2.** Les barres verdes indiquen segments d'hèlixs  $\alpha$  o estructures secundàries predites. Les línies vermelles marquen les zones predites com a dominis transmembrana (TM, de l'anglès *transmembrane domain*). S'indiquen les homologies de seqüència de les regions BH1 (línies marrons), BH2 (línies grises), BH3 (línies blaves) i BH4 (línies taronges). El domini BH3, particularment entre les proteïnes *BH3-only*, mesura la interacció entre aquestes proteïnes i el core de les proteïnes de la família de Bcl-2, promovent així el procés apoptòtic. Les cinc proteïnes de la part superior (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 i Mcl-1) són generalment anti-apoptòtiques. Les tres proteïnes en l'àrea ombrejada han estat menys estudiades per la qual cosa no poden ser categoritzades. Les 12 proteïnes inferiors són considerades pro-apoptòtiques, i es divideixen en dos grups, les proteïnes multidomini (multidomain) i les *BH3-only*. BIM, BAD i BMF són proteïnes que no tenen estructura Modificat de: (Youle and Strasser 2008).

S'han proposat dues teories per explicar el mecanisme d'acció de les proteïnes *BH3-only*. El model directe o neutre postula que aquestes proteïnes s'uneixen directament amb membres anti-apoptòtics de la família Bcl-2, que mantindrien en un estat inactiu a Bax i Bak (Uren, Dewson *et al.* 2007, Willis, Fletcher *et al.* 2007). En canvi, el model més acceptat s'anomena model jeràrquic (Figura 118) (Uren, Dewson *et al.* 2007, Willis, Fletcher *et al.* 2007). Aquest, planteja l'existència de dos grups de proteïnes *BH3-only*, els activadors directes i els repressors. El grup dels activadors està constituït per Bid, Bim i Puma, i estaria segregat per les proteïnes anti-apoptòtiques i seria el responsable directe de l'activació de Bax i Bak (Wei, Lindsten *et al.* 2000, Kuwana, Mackey *et al.* 2002). En el cas de Puma, s'ha vist que promou l'activació de Bax i Bak, però aquest efecte podria no ser directe (Chipuk, Fisher *et al.* 2008). El grup dels repressors estaria compost per Bad, Bik, Bmf, Hrk, Bik, BNIP3 i Noxa, i són responsables d'alliberar els activadors directes de la subfamília *BH3-only* que es troben segregats pels membres anti-apoptòtics (Galonek and Hardwick 2006) (Figura 118).

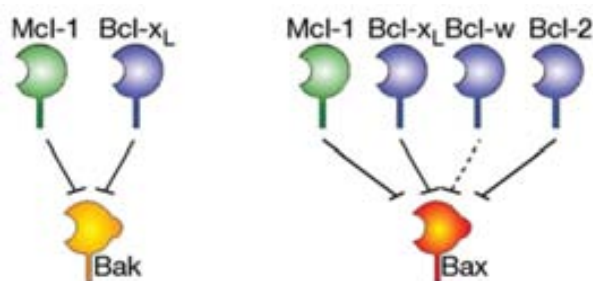


**Figura 118. Model Jeràrquic.** Pas 1: Proteïnes *BH3-only* específiques s'uneixen i inactiven a membres anti-apoptòtics de la família Bcl-2 en resposta a un estímul de mort. Pas 2: Proteïnes inactivadores (repressores) promouen la dissociació entre molècules anti-apoptòtiques de la família Bcl-2 i tBid, Bim i PUMA, provocant el seu alliberament. Pas 3: Els activadors, tBid, Bim i PUMA indueixen l'activació de Bax i Bak. tBid (forma truncada de Bid). Modificat de (Galonek and Hardwick 2006).

El seu mecanisme d'acció es coneix amb el nom de "mecanisme de repressió", on la proteïna anti-apoptòtica (per exemple Bcl-2) es troba formant un

complex amb una proteïna *BH3-only* activadora (Bid, Bim o Puma), impedit que aquestes puguin activar Bax o Bak. La unió d'una proteïna inactivadora (repressora) a una o més proteïnes anti-apoptòtiques permetria l'alliberament de les proteïnes activadores, que llavors podrien activar la oligomerització de Bax i Bak a la membrana mitocondrial externa per facilitar l'alliberament de citocrom c al citosol (Kuwana, Bouchier-Hayes *et al.* 2005, Chipuk, Fisher *et al.* 2008). Si bé la inhibició de les proteïnes anti-apoptòtiques contribueix a la desestabilització de la membrana mitocondrial externa, recentment s'ha suggerit que per a que aquesta desestabilització sigui efectiva es requereix l'acció de proteïnes BH3-only tant activadores com repressores (Merino, Giam *et al.* 2009).

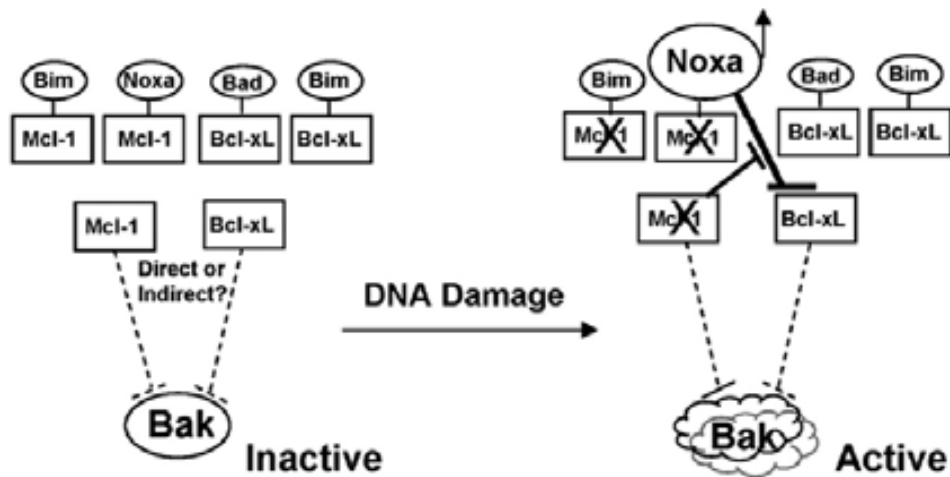
Recentment, diferents autors han proposat alternatives per complementar el model jeràrquic. Fletcher i Huang descriuen que la neutralització dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 és el punt clau per a la inducció de l'apoptosi, ja que aquests són els encarregats de segrestar Bax i Bak. Així, Bak pot interaccionar a través del motiu BH3 tant de Bcl-x<sub>L</sub> com de Mcl-1 però no el de Bcl-2. En canvi, Bax uniria a Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2 (Ding, Zhang *et al.* 2010) i probablement Bcl-w (Figura I19 i (Fletcher and Huang 2008)).



**Figura I19.** Els membres anti-apoptòtics tenen diferents afinitats per Bax i Bak. L'activació de Bak requereix la neutralització de només Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1, mentre que l'activació de Bax requereix l'inactivació de Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2 i probablement, Bcl-w. Modificat de (Fletcher and Huang 2008).

D'altres autors, descriuen que els agents que provoquen dany a l'ADN requereixen que Mcl-1 s'inactivi per permetre l'alliberament de la proteïna *BH3-only* Noxa. Una vegada alliberada, Noxa desencadena el dany mitocondrial a través de la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura I20 i (Lopez, Zhang *et al.* 2010)).

Així doncs, cada cop hi ha més informació sobre l'entrellat de les interaccions entre els membres de la família de Bcl-2, tot i que encara calen més estudis per acabar de descriure-les.



**Figura 120.** Model d'apoptosis induïda per dany a l'ADN a través de la família de Bcl-2 en cèl·lules HeLa. Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1 són els principals inhibidors de l'apoptosi en cèl·lules HeLa. Existeixen a la cèl·lula com a formes actives i inactives. Tot i que les formes inactives estan constitutivament unides a proteïnes *BH3-only*, les formes actives inhibeixen l'activació de Bak segrestant-la directament o bé segrestant les proteïnes *BH3-only* activadores. Quan es produeix dany a l'ADN, l'increment d'expressió de Noxa combinada amb l'eliminació o inactivació de Mcl-1, allibera Noxa que llavors pot inactivar Bcl-x<sub>L</sub> permetent l'activació de Bak. Modificat de (Lopez, Zhang *et al.* 2010).

### 6.1.1. Les proteïnes de la família de Bcl-2 com a dianes terapèutiques per al tractament de càncer

Tot i que els mecanismes pels quals una cèl·lula es transforma en tumoral són molt diversos i complexes, s'han descrit una sèrie de característiques que han de compartir aquestes cèl·lules per ser considerades tumorals (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011):

- Ser autosuficients en senyals de proliferació
- Presentar insensibilitat en front a senyals d'inhibició del creixement
- Capacitat d'evadir l'apoptosi
- Tenir un potencial replicatiu il·limitat
- Ser capaces d'induir angiogènesi
- Tenir capacitat invasiva i de generar metàstasi

Les cèl·lules transformades, són capaces d'evadir l'apoptosi mitjançant modificacions en proteïnes de les vies de senyalització de mort i, tal i com s'ha explicat a l'inici de la introducció, produïnt una ruptura de l'equilibri entre la

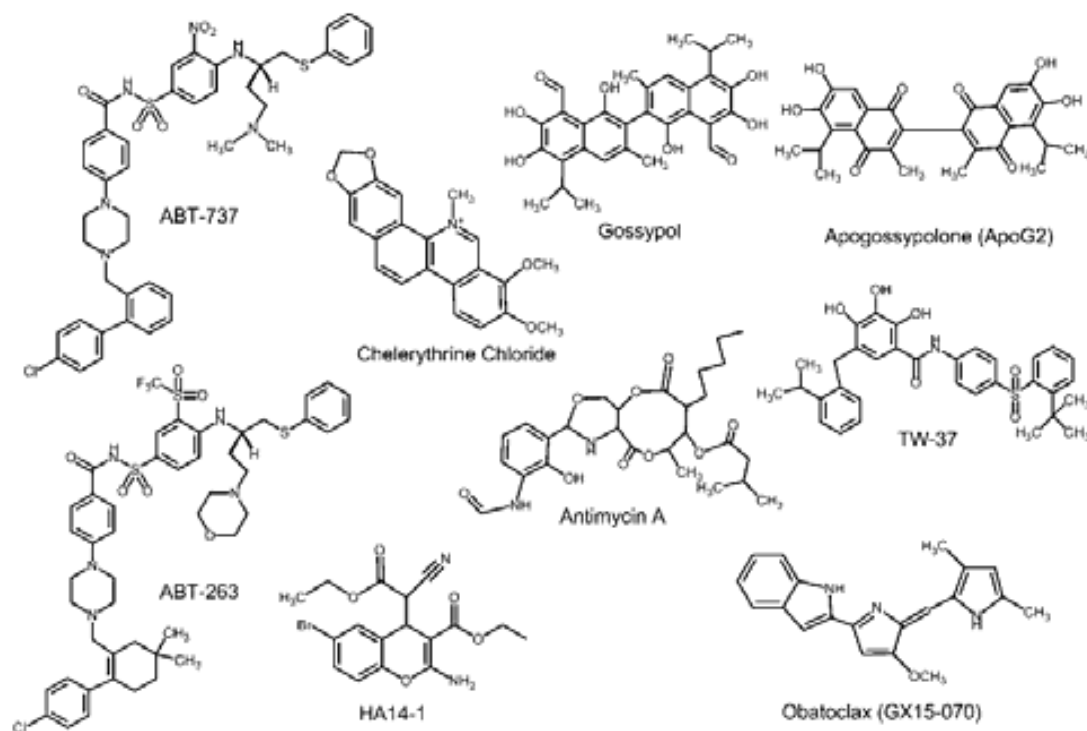


proliferació i la mort de les cèl·lules, fet que està estretament relacionat amb l'aparició de tumors (Ricci and Zong 2006).

Els fàrmacs que s'utilitzen en quimioteràpia són capaços d'induir la mort de les cèl·lules tumorals, però en la majoria dels casos, les cèl·lules no transformades també responen a aquests fàrmacs i, o bé aturen el seu cicle cel·lular per poder reparar el seu ADN, o bé acaben morint si el dany és molt sever (Ricci and Zong 2006). Per aquest motiu, els fàrmacs quimioterapèutics que s'estan dissenyant en els últims anys actuen contra dianes específiques en funció del tipus de vies de senyalització que es trobin alterades en les cèl·lules tumorals (Fulda, Galluzzi *et al.* 2010). Aquest tipus d'estratègia anti-tumoral, presenta l'avantatge de ser altament selectiva contra les cèl·lules que estan transformades, ja que aquestes depenen d'aquestes alteracions en les vies de senyalització de mort per a la seva supervivència. Com que aquest tipus de fàrmacs actuen a nivell de dianes molt concretes que són imprescindibles per a les cèl·lules malignes però no per les sanes, l'efecte tòxic en les cèl·lules sanes de l'organisme s'espera que sigui mínim (Grimm and Noteborn 2010).

Les proteïnes de la família de Bcl-2, com veurem a l'apartat de "La via intrínseca", juguen un rol essencial en la ruta mitocondrial de l'apoptosi, per la qual cosa no és estrany que en els últims anys s'hagin convertit en dianes terapèutiques importants per al tractament del càncer (Marzo and Naval 2008, Frenzel, Grespi *et al.* 2009). Avui en dia, existeixen evidències suficients que demostren que la ratio entre proteïnes anti-apoptòtiques i pro-apoptòtiques de la família de Bcl-2 determina la susceptibilitat de les cèl·lules cancerígenes a l'apoptosi (Fulda, Galluzzi *et al.* 2010). Múltiples estudis han demostrat el paper essencial de les proteïnes *BH3-only* en la resposta citotòxica a agents anticancerígens (Han, Flemington *et al.* 2001, Nakano and Vousden 2001, Yu, Zhang *et al.* 2001). A més a més, la quimioresistència de molts càncers s'atribueix a la pèrdua o a baixos nivells d'expressió de proteïnes *BH3-only* (Jeffers, Parganas *et al.* 2003, Villunger, Michalak *et al.* 2003). Per això, una de les estratègies que s'utilitza per a induir apoptosi en cèl·lules cancerígenes és intentar decantar la balança cap als membres pro-apoptòtics utilitzant pèptids-BH3 de proteïnes *BH3-only* o molècules petites orgàniques que mimetitzen el pèptid BH3 i que s'uneixen als membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en

el seu solc hidrofòbic. La cerca d'inhibidors per a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w i Mcl-1 va resultar en diversos candidats (Enyedy, Ling *et al.* 2001, Tzung, Kim *et al.* 2001, Kitada, Leone *et al.* 2003, Tang, Ding *et al.* 2007, Ponassi, Biasotti *et al.* 2008). Aquestes molècules s'anomenen en anglès *BH3-mimetics* (Figura I21).



**Figura I21.** Estructura d'alguns dels inhibidors de Bcl-2. Font (Vogler, Dinsdale *et al.* 2009).

D'aquestes molècules incidirem en aquelles que s'han utilitzat en aquest treball de tesi:

- **ABT-737:** s'ha demostrat que a nivell individual, és capaç de matar de forma efectiva cèl·lules d'alguns tumors i causar-ne la regressió d'alguns altres (Oltersdorf, Elmore *et al.* 2005). Les seves dianes són Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w però no Mcl-1 ni Bfl-1/A1 (Oltersdorf, Elmore *et al.* 2005, van Delft, Wei *et al.* 2006). Existeix una forma oral, l'**ABT-263** o Navitoclax (Tse, Shoemaker *et al.* 2008).
- **Gossypol:** és un producte natural derivat de la planta del cotó. Sembla que inhibeix a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1, tot i que existeix certa controvèrsia al respecte (Vogler, Dinsdale *et al.* 2009).

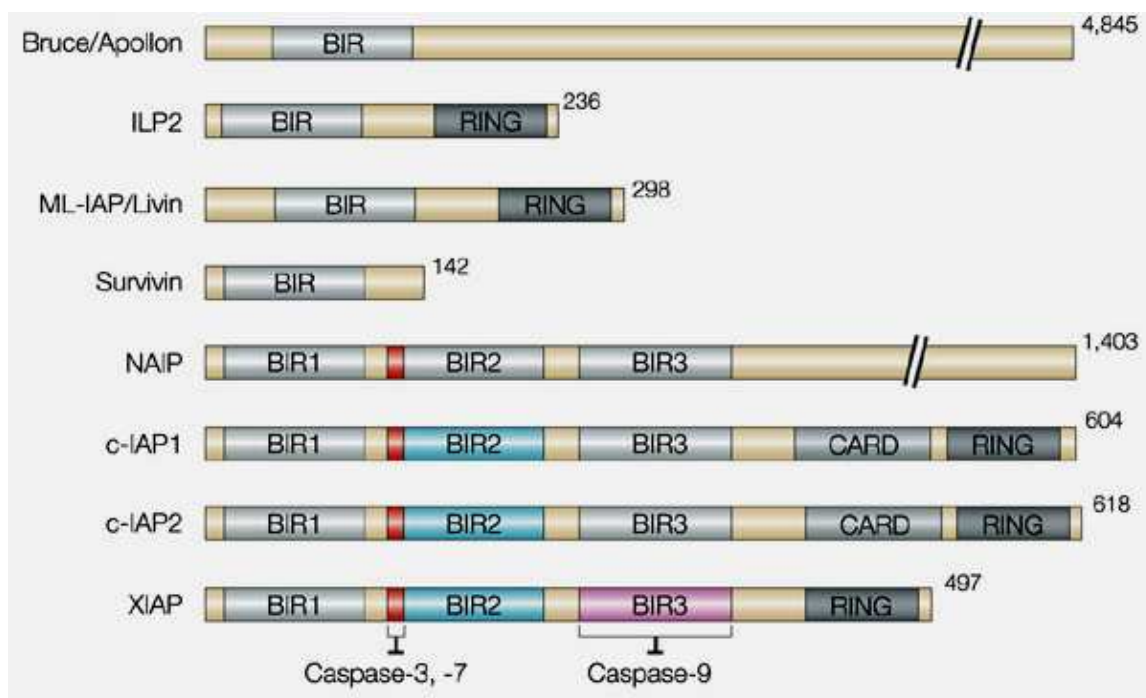
- **GX15-070/Obatoclox:** és capaç d'inhibir els cinc membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 però amb una afinitat baixa (Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006, Zhai, Jin *et al.* 2006). Va ser sotmès al 2009 a proves clíniques en pacients de fase I i II per al tractament de tumors sòlids i hematològics (Shore and Viallet 2005, Nguyen, Marcellus *et al.* 2007). Publicacions recents, demostren que pacients amb limfoma de Hodgkin GX15-070 va resultar tenir efectivitat limitada (Oki, Copeland *et al.* 2012).
- **TW-37:** es coneix encara poc sobre aquest inhibidor. Es va dissenyar amb una estratègia basada en la seva estructura i sembla ser que inhibeix a Bcl-2 i Mcl-1 amb més afinitat i Bcl-x<sub>L</sub> amb menys afinitat (Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006) o segons altres autors també amb alta afinitat (Verhaegen, Bauer *et al.* 2006).

Cal tenir en compte que, fins al moment, l'únic compost que s'ha demostrat que és realment un *BH3-mimetic* pur i que per tant, indueix mort específicament perquè inhibeix als membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 és ABT-737 i la seva forma oral ABT-263 (van Delft, Wei *et al.* 2006, Tse, Shoemaker *et al.* 2008). Això suggereix que d'altres compostos poden tenir dianes addicionals que poden causar toxicitat de forma inespecífica, no prevista i no desitjada. Així doncs, com més específic és l'inhibidor, menys probabilitat hi ha de que causi mort cel·lular no controlada i, per tant, efectes tòxics no desitjats (Vogler, Dinsdale *et al.* 2009).

## 6.2. Proteïnes inhibidores de l'apoptosi o IAPs

Les cèl·lules tenen multitud d'inhibidors específics que poden contenir i / o bloquejar l'activació de caspases i, per tant, l'apoptosi. Una d'aquestes famílies està constituïda per les proteïnes inhibidores de l'apoptosi o IAPs (de l'anglès, Inhibitors of Apoptosis Proteins), inicialment identificades en baculovirus (Crook, Clem *et al.* 1993). Els IAPs pertanyen a una família composta per diversos membres (Figura I22). En humans, els més ben caracteritzats són: XIAP (de l'anglès, *X-linked Inhibitor of apoptosis protein*), cIAP1 (de l'anglès, *cellular Inhibitor of apoptosis protein-1*), cIAP2 (de l'anglès, *cellular Inhibitor of apoptosis protein-2*), Naip (*neuronal Inhibitor of apoptosis protein*) i survivina (Schimmer

2004). Les IAPs inhibeixen l'activació de caspases a través d'una seqüència d'aminoàcids conservats anomenada domini BIR (de l'anglès, *baculoviral IAP repeats*). Totes les IAPs de mamífers contenen, en la seva regió N-terminal, tres dominis BIR (BIR1, BIR2 i BIR3), excepte survivina que posseeix un únic domini (Zimmermann, Bonzon *et al.* 2001). Els dominis BIR estan constituïts per aproximadament 80 aminoàcids i es troben definits per una sèrie de residus histidina i cisteïna conservats que coordinen un ió zinc (Hinds, Norton *et al.* 1999). S'ha vist que el domini BIR es troba estructuralment fortament conservat des de virus fins als mamífers. Malgrat això, l'existència de diferències específiques en la seqüència dels BIR dona origen a propietats d'unió diferents per a cada un d'aquests dominis. A més, la presència de múltiples dominis BIR confereix a les IAPs l'habilitat de reclutar les proteïnes substrat per a la seva ubiquitinització i / o en alguns casos, per inhibir-les.



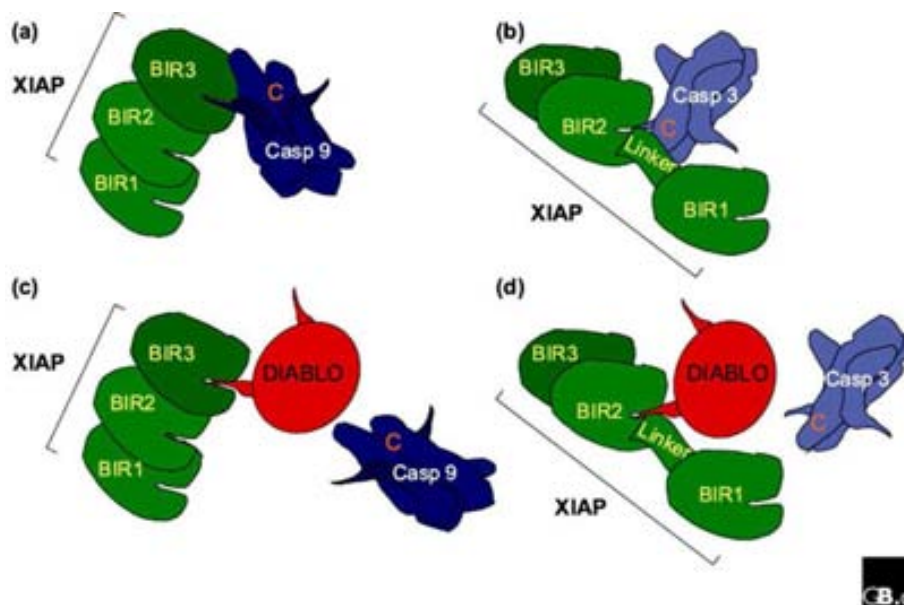
**Figura I22. Estructura de les proteïnes humanes de la família de les IAPs.** La família de les IAPs inclou les proteïnes XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2 (de l'anglès, *IAP-like protein-2*), ML-IAP (de l'anglès, *melanoma IAP*) / Livin, Naip i survivina. A més d'estar constituïdes per almenys un domini BIR, les IAPs tenen també un domini CARD i un motiu RING. El pèptid que precedeix el domini BIR2 de XIAP, c-IAP1 o c-IAP (indicat en vermell) és responsable de la inhibició de caspasa-3 i -7 en mamífers. En el cas de caspasa-9, només el domini BIR3 de XIAP és capaç d'aconseguir una potent inhibició. Els dominis BIR caracteritzats bioquímicament i que tinguin funcions conegudes s'indiquen en color, mentre que la resta de dominis dels IAPs es mostren en gris (Font: (Shi 2001)).

XIAP és l'única IAP de mamífer que funciona com un inhibidor directe de caspases en un sentit estrictament bioquímic (Eckelman, Salvesen *et al.* 2006). Aquesta proteïna és capaç d'unir i inhibir a les caspasa-3, -7 i -9 (Chai, Shiozaki *et al.* 2001, Huang, Park *et al.* 2001, Riedl, Renatus *et al.* 2001). El mecanisme a través del qual XIAP inhibeix a caspasa-9 consisteix en que el domini BIR3 de XIAP s'uneix a la superfície d'homodimerització de caspasa-9, interferint així amb la dimerització i activació d'aquesta proteasa (Shiozaki, Chai *et al.* 2003) (Figura 122a i b). Cal ressaltar que les anàlisis mutacionals indiquen que únicament caspasa-9 processada és capaç de ser inhibida per XIAP (Sun, Cai *et al.* 2000). Així doncs, la resta de IAPs inhibeixen a les caspases efectores de forma indirecta. Hi ha residus aminoacídics entre els dominis BIR1 i BIR2 de les IAPs que s'uneixen al lloc actiu de caspasa-3 i -7 impeding la unió de la caspasa amb el seu substrat, inhibint així l'activitat catalítica de la caspasa. Així mateix, el domini BIR2 és capaç d'unir-se a neo-epítops de caspasa-3 i -7 generats durant l'activació d'aquestes, que promouen un augment en l'afinitat de XIAP per la proteasa, un fenomen que resulta essencial per a inhibir efectivament a les caspases executores (Riedl, Renatus *et al.* 2001, Scott, Denault *et al.* 2005).

Una altra regió important implicada en la inhibició de l'apoptosi, és el domini RING en la porció C-terminal dels IAPs, el qual actua com un enzim ubiquitina lligasa i promou la poli-ubiquitinació de caspasa-3 i -7, provocant o bé la seva degradació (Choi, Butterworth *et al.* 2009), o bé la seva inactivació no degradativa (Schile, Garcia-Fernandez *et al.* 2008). Sembla que, *in vivo*, XIAP requereix, a més dels dominis BIR, un domini RING funcional per exercir completament el seu potencial anti-apoptòtic (Schile, Garcia-Fernandez *et al.* 2008). Es tracta d'un domini petit (40 aminoàcids) definit per vuit residus cisteïna i histidina que coordinen dos ions zinc (Silke, Kratina *et al.* 2005). A través d'aquest domini, les IAPs són capaces de formar homo i heterodímers (Mace, Linke *et al.* 2008).

A més dels motius descrits, algunes IAPs (XIAP, cIAP1 i cIAP2) tenen una regió petita, a continuació de l'últim domini BIR, que posseeix homologia amb els dominis associats a ubiquitina (UBA, de l'anglès, *ubiquitin-associated*) i que és capaç d'interactuar amb proteïnes ubiquitinades a través d'un motiu hidrofòbic

MG(F/I) (Gyrd-Hansen, Darding *et al.* 2008, Blankenship, Varfolomeev *et al.* 2009). En el cas particular de cIAP1 i cIAP-2 hi ha un domini CARD (Figura I22), localitzat entre els dominis UBA i RING, que suggereix que aquestes molècules podrien regular, ja sigui de manera directa o indirecta, el processament de caspases iniciadores (Zimmermann, Bonzon *et al.* 2001).



**Figura I22. Mecanisme d'inhibició de les caspases per part de les IAPs i la seva prevenció mitjançant l'antagonista Smac / DIABLO.** a) Un cop processada caspasa-9, la regió N-terminal de la subunitat petita (p10) interactua fortament amb un solc del domini BIR3 de XIAP. b) El pèptid d'unió entre els dominis BIR2 i BIR3 de XIAP s'uneix potentment al lloc catalític de caspasa-3 (o de caspasa-7), provocant una inhibició efectiva de la proteasa. També s'ha proposat una interacció, encara que menys significativa, de l'extrem N-terminal de la subunitat petita de caspasa-3 amb un solc del domini BIR2. c) La regió amino terminal d'Smac / DIABLO és similar a la de caspasa-9 pel que competeix amb aquesta pel mateix lloc d'unió al domini BIR3. d) Es creu que un solc similar al domini BIR2 de XIAP és responsable de la interacció amb Smac / DIABLO, la qual cosa proveeix un mecanisme per dissociar el complex caspasa-3-XIAP Font: (Verhagen, Coulson *et al.* 2001).

En mamífers, un cop induït un estímul apoptòtic, la inhibició per part de les IAPs és alliberada quan es produeix la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i proteïnes pro-apoptòtiques, com ara Smac / DIABLO (de l'anglès, *Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low pI*) i HtrA2 / Omi (de l'anglès, *High-Temperature-Requirement Protein*

A2), són alliberades al citosol (Du, Fang *et al.* 2000, Verhagen, Ekert *et al.* 2000, Suzuki, Imai *et al.* 2001, Martins, Iaccarino *et al.* 2002). Aquestes proteïnes tenen una seqüència N-terminal conservada de quatre residus (AVPI en el cas de Smac / DIABLO i AVPS per HtrA2 / Omi), que constitueixen el motiu d'unió a IAP anomenat IBM (de l'anglès, *IAP-binding motif*). El motiu IBM s'uneix al mateix lloc que l'N-terminal de caspasa-9, de manera que quan l'IBM interactua amb el domini BIR3 de les IAPs, desplaça directament a caspasa-9 promovent l'activació d'aquesta (Liu, Sun *et al.* 2000, Shiozaki, Chai *et al.* 2003). D'altra banda, en el cas de les caspases executores, la interacció de les proteïnes que posseeixen el domini IBM amb el domini BIR2 de les IAPs, és responsable d'un impediment estèric que impedeix la unió de les caspases a la regió d'unió entre els dominis BIR2 i BIR3 existent en les IAPs (Chai, Du *et al.* 2000, Srinivasula, Hegde *et al.* 2001) (Figura I22c i d).

### 6.3. Smac / DIABLO i Htr2A/Omi: antagonistes de les IAPs

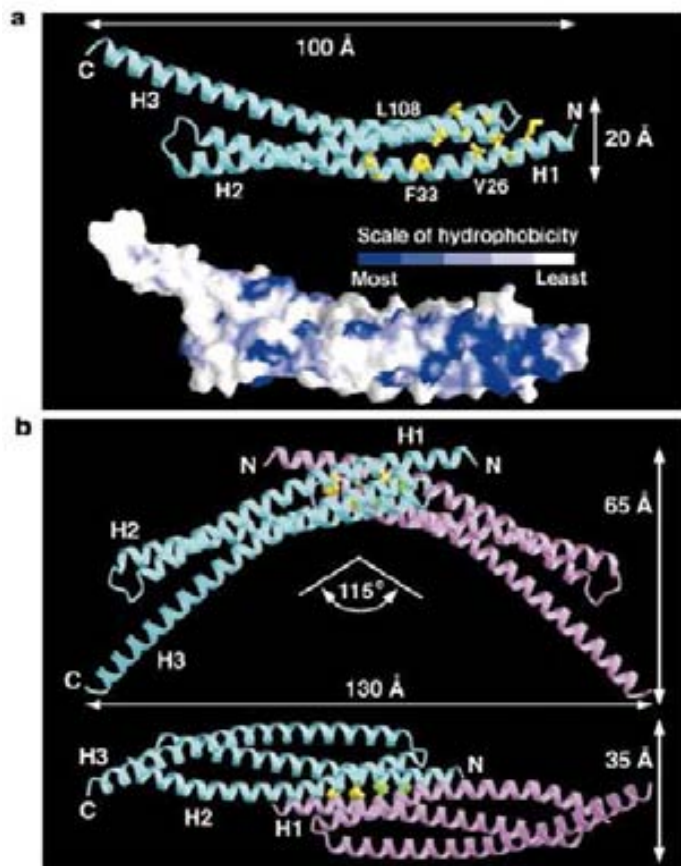
L'activitat inhibidora de les IAPs està subjecte a un control negatiu. Aquest control es dona de manera indirecte quan, un cop caspasa-9 ha estat activada per l'apoptosoma i activa a caspasa-3, aquesta última processa a caspasa-9 de forma irreversible de manera que ja no pot unir XIAP, promovent així una retroalimentació positiva de l'activació de caspasa-9. D'altra banda, el control es produeix també de forma directe a través de la unió d'antagonistes, proteïnes pro-apoptòtiques com Smac / DIABLO o Htr2A / Omi.

➤ **Smac / DIABLO.** Va ser identificada per dos grups independents l'any 2000 com una proteïna capaç de promoure l'apoptosi a través de la unió a les IAPs (Du, Fang *et al.* 2000, Verhagen, Ekert *et al.* 2000). El mateix any, dos altres grups independents van poder definir la seva estructura gràcies a la resolució de l'estructura cristal·logràfica del complex Smac-XIAP (Chai, Du *et al.* 2000, Wu, Chai *et al.* 2000).

Smac / DIABLO és una proteïna mitocondrial i la seva forma immadura està codificada pel genoma nuclear. Es sintetitza com una molècula presursora de 239 aminoàcids. Poseeix una seqüència de localització a la mitocòndria (MLS, de l'anglès, *mitochondrial localization signal*) de 55 residus en el seu

domini N-terminal. La seqüència MLS és eliminada per proteòlisi un cop Smac / DIABLO s'importa dins la mitocòndria i, això, genera un polipèptid madur que conté 184 aminoàcids i pesa 23 kDa, que resideix a l'espai intermembrana (Du, Fang *et al.* 2000, Verhagen, Ekert *et al.* 2000) i que en solució es comporta com un oligòmer (Du, Fang *et al.* 2000). Aquesta maduració proteolítica permet que Smac / DIABLO exposi el seu domini IBM al seu extrem N-terminal (Liu, Sun *et al.* 2000, Wu, Chai *et al.* 2000).

Pel que fa referència a la seva estructura tridimensional, Smac / DIABLO és un monòmer allargat que conté tres hèlix unides entre elles amb una curvatura moderada (Figura I23a).

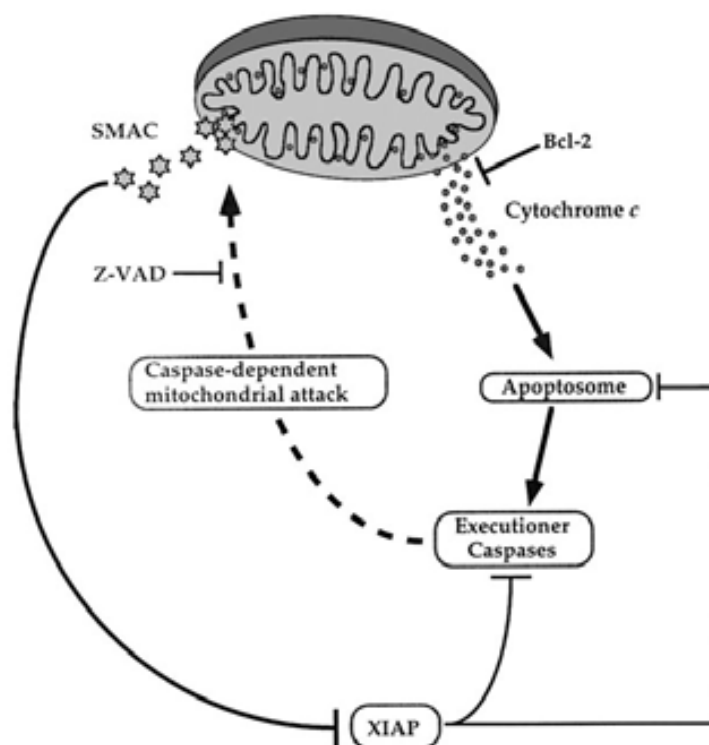


**Figura I23. Representació esquemàtica de l'estructura d'Smac / DIABLO.** a) L'estructura allargada del monòmer d'Smac / DIABLO. La superfície hidrofòbica està representada en blau fosc (part inferior) i els residus que la constitueixen en groc (part superior). b) Estructura arquejada del dímer d'Smac / DIABLO, amb els dos monòmers que el formen de color cian i rosa, respectivament. Es mostren dues vistes en l'eix horitzontal. Colorejats en groc i verd per cada una de les molècules del dímer, es mostren tres residus crítics a la interfície dimèrica (V26, F33 i L108). Modificada de (Chai, Du *et al.* 2000).

L'hèlix H1 està col·locada contra les hèlixs H2 i H3, mentre que les hèlixs H2 i H3 estan separades entre elles. La majoria dels residus hidrofòbics estan localitzats a una regió d'unió entre les tres hèlixs, contribuint així a la seva estabilitat. A més a més, les hèlixs allargades estan reforçades per ponts d'hidrogen. Aproximadament la meitat dels residus hidrofòbics que es troben exposats, es troben agrupats en una petita àrea a la meitat N-terminal de H1 i al



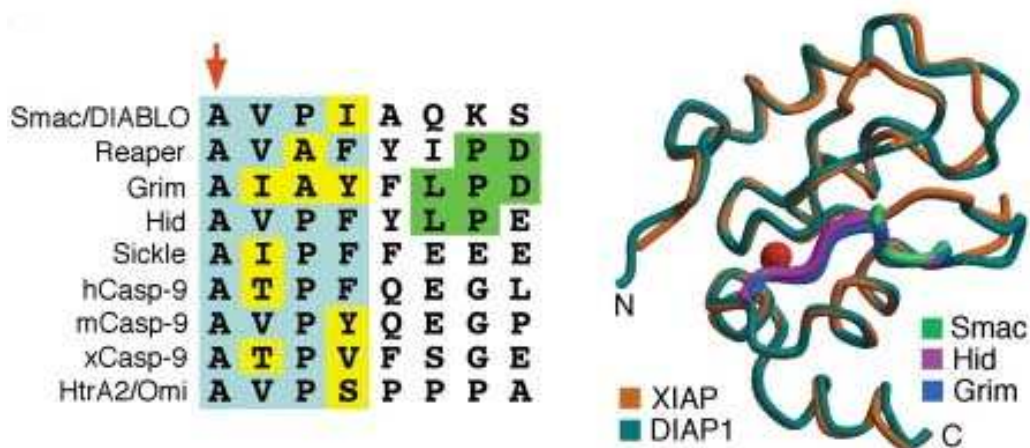
terç C-terminal de H2 (Figura I23a), indicant que aquesta regió podria estar involucrada en interaccions proteïna-proteïna importants. Quan Smac / DIABLO dimeritza, ho fa de forma simètrica a través dels residus hidrofòbics, prèviament esmentats, de l'àrea entre H1 i H2 (Figura I23b). D'aquesta manera es crea una molècula més allargada i arquejada, amb l'N-terminal a la part superior i el C-terminal a la part inferior de l'arc (Figura I23b).



**Figura I24. Model hipotètic de l'alliberament d'Smac / DIABLO regulat pels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 i per caspases.** La capacitat dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 de regular l'alliberament d'Smac / DIABLO pot derivar-se de la seva capacitat de bloquejar la sortida de citocrom c de la mitocondria. Una vegada alliberat de la mitocondria, citocrom c promou la formació de l'apoptosoma, que promourà l'activació de caspasa-9 i la propagació de la cascada de les caspases. En aquestes condicions, XIAP podria atenuar l'activitat caspasa, integrant-se en el complex de l'apoptosoma o bé inactivant a les caspases executores -3 i -7. En contra partida, l'acció de les caspases podria promoure l'obertura de porus a la membrana mitocondrial externa per permetre la sortida d'Smac / DIABLO. Una vegada alliberat al citosol, promouria l'activitat de les caspases a través de la seva unió a IAPs que les inactivaria. Modificat de: (Adrain, Creagh *et al.* 2001).

Com s'ha dit, de la mateixa manera que citocrom c, Smac / DIABLO es localitza normalment a l'espai intermembrana de la mitocondria. En resposta a un estímul apoptòtic es genera la permeabilització de la membrana mitocondrial

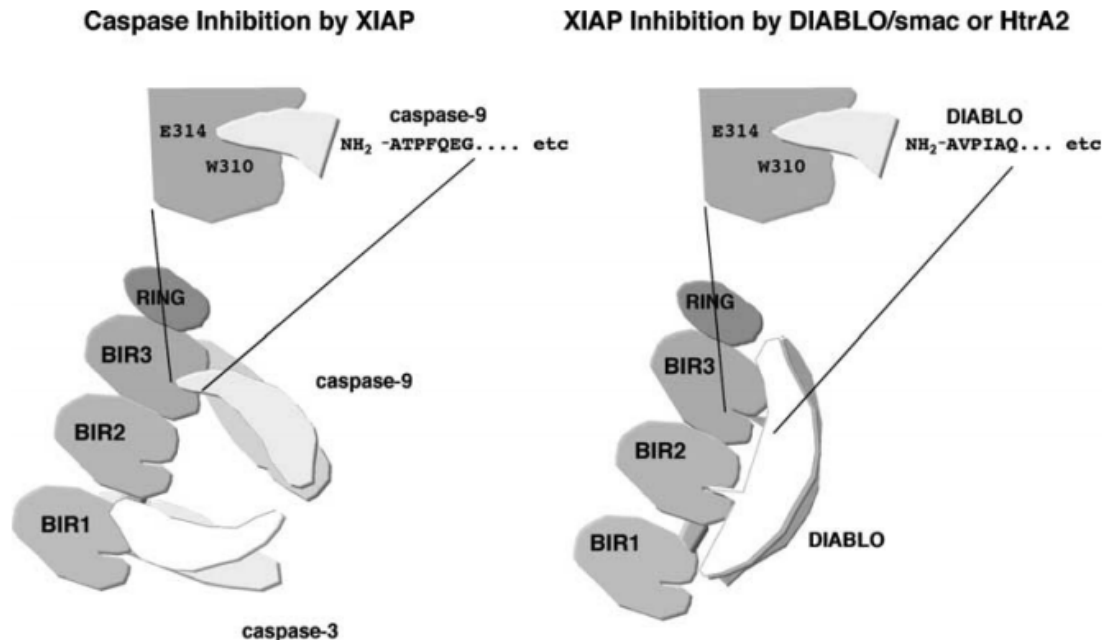
externa, i Smac / DIABLO s'allibera al citosol on neutralitza els inhibidors engogens de les caspases, els IAPs, afavorint així l'activació de les caspases (Figura I24). L'alliberament d'Smac / DIABLO es produiria pels mateixos porus i amb el mateix mecanisme de difusió passiva pel quals s'allibera citocrom c, tot i que s'ha descrit la possibilitat que nivells elevats de XIAP al citosol podrien impedir o limitar l'alliberament d'Smac / DIABLO (Flanagan, Sebastia *et al.* 2010). Smac / DIABLO és capaç d'unir-se a diverses IAPs, incloent XIAP, cIAP1, cIAP2, survivina i Apollon (Du, Fang *et al.* 2000, Verhagen, Ekert *et al.* 2000) i, així, sembla que podria actuar com una proteïna reguladora de l'apoptosi en mamífers i com a homòleg funcional de les proteïnes de *Drosophila* Reaper, Grim i Hid (Shi 2002) (Figura I25).



**Figura I25. Motiu conservat d'unió a les IAPs (IBM).** A l'esquerra es representa la comparació de les seqüències del tetrapèptid d'Smac / DIABLO, Reaper, Grim, Hid, Sickle, caspasa-9 i HtrA2 / Omi. Les proteïnes de *Drosophila* tenen un component addicional d'unió marcat en verd. El primer residu d'alanina és el responsable d'unir la butxaca hidrofòbica i establir ponts d'hidrogen amb residus de XIAP. A la dreta, l'estructura d'IAP2-BIR2 (turquesa) es superposa amb el domini XIAP-BIR3 (marró), amb els seus corresponents pèptids d'unió Hid (rosa), Grim (blau) i Smac/DIABLO (verd). Modificat de (Shi 2002).

De totes maneres, cal ressaltar que la principal molècula diana d'Smac / DIABLO és la proteïna XIAP (Bratton and Cohen 2003, Shiozaki and Shi 2004). Smac / DIABLO s'uneix a les IAPs a través dels dominis BIR d'aquestes proteïnes (Vaux and Silke 2003). Quan Smac / DIABLO és funcional, existeix com a homodímer (Chai, Du *et al.* 2000) i, per tant, exposa dos motius IBM (Chai, Du *et al.* 2000, Wu, Chai *et al.* 2000). Un dímer d'Smac / DIABLO és

capaç d'unir a una molècula de XIAP a través d'aquests dos dominis IBM, ja que un interacciona amb el BIR2 i el segon amb el BIR3 de XIAP (Huang, Rich *et al.* 2003) (Figura I26), desplaçant així a XIAP de les caspases activades (Ekert, Silke *et al.* 2001).



**Figura I26.** Inhibició de caspasa-9 i caspasa-3 per XIAP (panell esquerre) i unió d'Smac / DIABLO a XIAP (panell de la dreta), indicant com Smac / DIABLO evita que XIAP inhibeixi a les caspases. La manera com XIAP inhibeix a caspasa-9 és diferent de com inhibeix caspasa-3, ja que l'N-terminal processat de caspasa-9 encaixa en el solc de BIR3, mentre que el punt d'interacció entre XIAP i caspasa-3 és una regió d'unió entre els dominis BIR1 i BIR2 de XIAP. XIAP conté uns residus en el domini BIR3 que són crítics (E314 i W310 indicats a la figura), ja que formen un solc que permet que s'uneixi al domini processat a N-terminal tant de caspasa-9 com d'Smac / DIABLO. Font: (Vaux and Silke 2003).

La funció fisiològica d'Smac / DIABLO a l'espai intermembrana de la mitocòndria encara no està clara. Si bé Smac / DIABLO és capaç de sensibilitzar les cèl·lules a un estímul de mort, com ara les radiacions ultraviolades, la seva expressió forçada no és suficient per activar la mort cel·lular apoptòtica (Du, Fang *et al.* 2000, Hunter, Kottachchi *et al.* 2003). A més, el ratolí *knockout* per Smac / DIABLO no exhibeix alteracions fenotípiques i és tan sensible com el *wild type* a l'apoptosi induïda per "receptors de mort" (Okada, Suh *et al.* 2002). Cèl·lules aïllades d'aquests animals responen de forma normal a inductors de mort com la irradiació ultravioleta, l'estaurosporina, l'etopòsid o Fas (Okada, Suh

*et al.* 2002). Aquest fet suggereix la possible existència d'altres molècules i / o vies alternatives en absència d' Smac / DIABLO (Okada, Suh *et al.* 2002, Vaux and Silke 2003).

➤ **Htr2A / Omi:** és la segona proteïna que s'ha assenyalat com inhibidora de les IAPs. És una serina proteasa la funció de la qual en cèl·lules no estimulades és la de mantenir la homeòstasi mitocondrial. Després de ser alliberada al citosol, en resposta a un estímul apoptòtic, aquesta molècula promou la mort cel·lular tant per la inhibició de les IAPs com per un mecanisme independent de caspases, segons la seva activitat serina proteasa (Yang, Church-Hajduk *et al.* 2003, Garrido and Kroemer 2004). Htr2A / Omi no té cap funció en la cadena de transport electrònic mitocondrial (a diferència dels altres factors apoptogènics que s'alliberen de la mitocòndria), encara que es postula que potser participi en el control del plegament proteic en la mitocòndria (Vande Walle, Lamkanfi *et al.* 2008).

## 7. Vies de senyalització de l'apoptosi

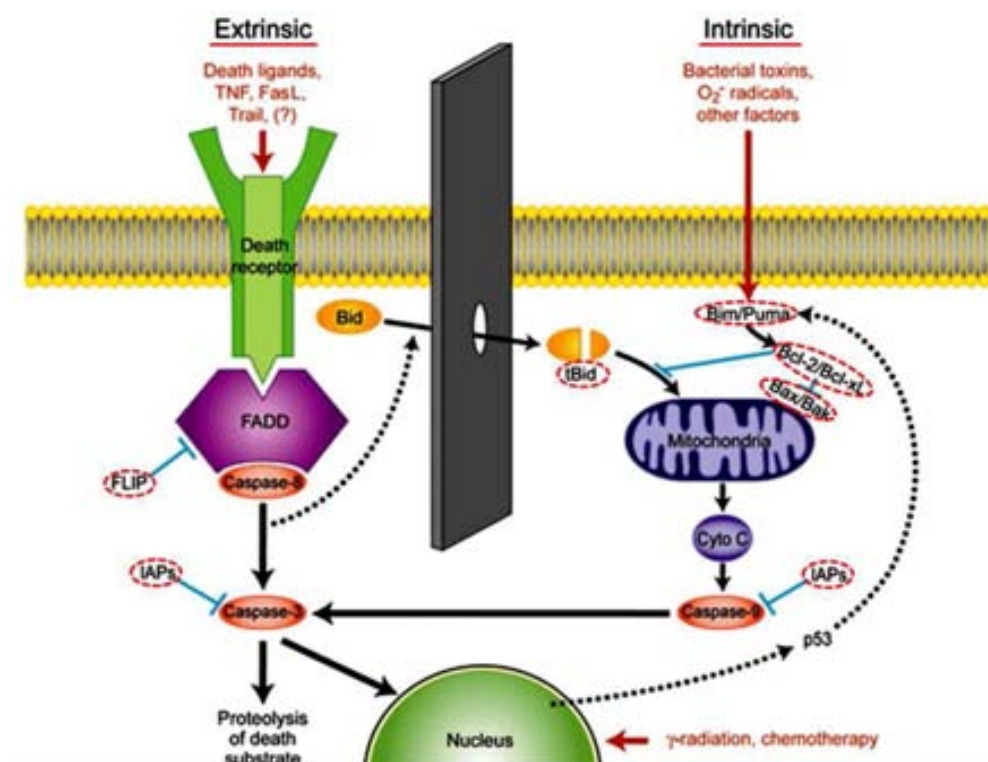
En mamífers, l'apoptosi pot ocórrer a través de dues rutes de senyalització diferents: la via intrínseca i la via extrínseca (Figura I27). La via extrínseca rep estímuls provinents de l'exterior cel·lular quan els lligands de mort s'uneixen als seus "receptors de mort" (DRs, de l'anglès *Death Receptors*) que estan localitzats a la superfície cel·lular (Ashkenazi and Dixit 1998). En canvi, la via intrínseca s'activa principalment per estímuls provinents de l'interior de la cèl·lula, com per exemple agents quimioteràpics, i és dependent de l'alliberació de factors pro-apoptogènics des de la mitocòndria (Joza, Kroemer *et al.* 2002, Gonzalez and Ashkenazi 2010). Ambdues vies culminen en l'activació de les caspases que duren a terme el procés apoptòtic (Lavrik, Golks *et al.* 2005, Li and Yuan 2008).

### 7.1. La via extrínseca

La via extrínseca es troba mediada per l'activació dels DRs. Aquests receptors, es situen en la superfície cel·lular i transmeten el senyal apoptòtic un cop unit el lligant específic. La via extrínseca està governada per la superfamília

de TNF (de l'anglès, *Tumor Necrosis Factor*) que inclou prop de 20 lligands homòlegs diferents i els seus receptors corresponents.

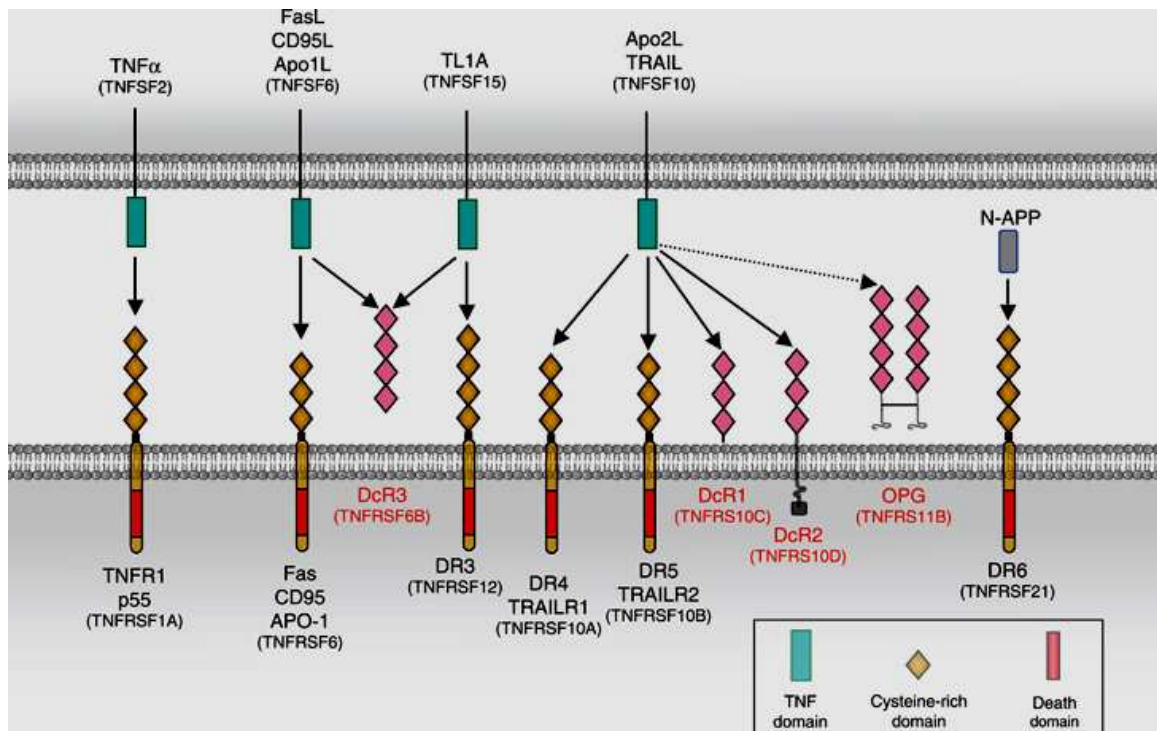
Els DRs (Figura I28), són proteïnes integrals transmembrana de tipus I. El domini N-terminal extracel·lular dels DRs és ric en cisteïnes, mentre que a nivell intracel·lular (C-terminal), tenen una regió anomenada domini de mort (DD, de l'anglès *Death Domain*). Aquest últim permetrà el reclutament d'una sèrie de proteïnes adaptadores que iniciaran la senyalització apoptòtica. En humans s'han caracteritzat 6 DRs pertanyents a la superfamília del receptor de TNF: TNFR1 (també conegut com a DR1, CD120a, p55 i p60), CD95 (també anomenat DR2, Fas i Apo-1), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP i WSLT), TRAILR1 (DR4 o APO-2), TRAILR2 (DR5, KILLER i TRICK2), i per últim DR6 (TNFRSF21).



**Figura I27. Vies d'activació de les caspases.** Representació esquemàtica de la via extrínseca (mediada per "receptors de mort") i intrínseca (iniciada per estímuls intracel·lulars: estrès, dany a l'ADN, entre d'altres). Les proteïnes marcades amb puntejat vermell són els principals punts de regulació d'aquestes vies (Modificat de Emerg Infect Disease © 2007. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)).

Els lligands que activen aquests receptors, a excepció del factor de creixement nerviós (NGF), són molècules relacionades estructuralment que

pertanyen a la superfamília gènica del TNF (Smith 1994). El lligand CD95L / FasL s'uneix a CD95 / Fas; TNF $\alpha$  i linfoxina  $\alpha$  s'uneixen a TNFR1, el lligand TL1A (també anomenat Vegi, de l'anglès, *Vascular endothelial cell growth Inhibitor*) s'uneix a DR3, i TRAIL (de l'anglès, *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand*) s'uneix a DR4 / TRAIL-R1 i DR5 / TRAIL-R2 (Ashkenazi and Dixit 1998). Els lligands dels DRs també poden interaccionar amb els receptors "esquer" (DcRs, de l'anglès, *decoy receptors*) que no tenen DD i per tant no formen complexos de senyalització de mort. Fins ara, es coneixen 4 DcRs: DcR1 (anomenat també TRAIL-R3), DcR2 (conegut com TRAIL-R4), DcR3 i osteoprotegerina (OPG). (Figura I25) (Revisat a (Gonzalvez and Ashkenazi 2010)).

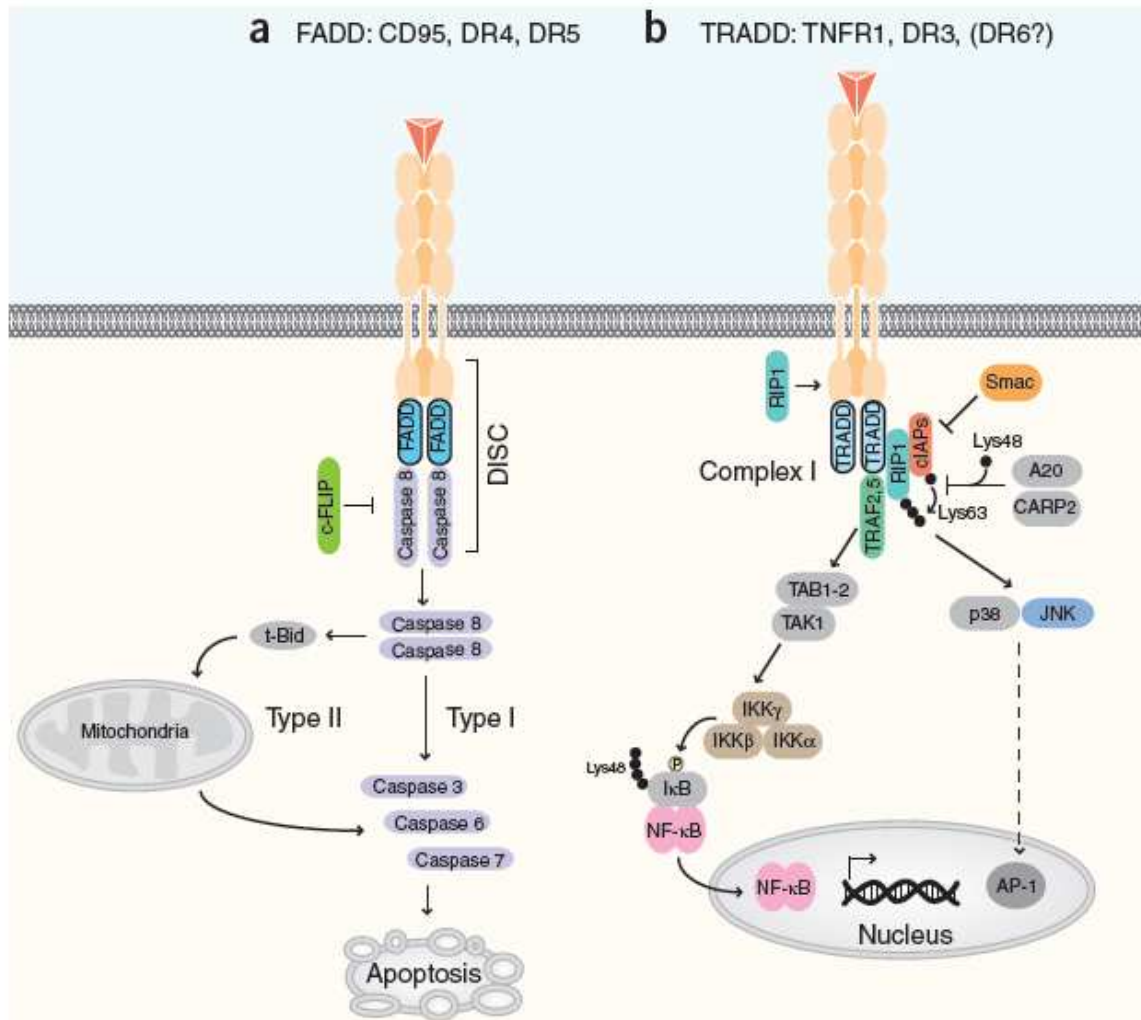


**Figura I28. “receptors de mort” i els seus lligands.** S'han identificat sis DRs humans i els seus respectius lligands: TNFR1 s'uneix a TNF- $\alpha$ , Fas reconeix FasL, DR3 uneix TL1A, DR4 i DR5 uneixen Apo2L/TRAIL i DR6 reconeix N-APP. Els receptors decoy (DcRs) no són capaços de senyalitzar i competeixen amb els DR pel seu lligant. Tant DcR1 com DcR2 competeixen amb DR4 i DR5 per la unió de Apo2L/TRAIL. Osteoprotegerina (OPG) també competeix amb aquests receptors, encara que ho fa amb menor afinitat que els DcRs. D'altra banda, DcR3 competeix amb Fas per la unió de FasL i amb DR3 per la unió de TL1A Font: (Gonzalvez and Ashkenazi 2010).



### 7.1.1. Vies de senyalització dels “receptors de mort”

Quan els lligands s'uneixen als seus DRs específics, aquests recluten una de les dues proteïnes adaptadores: FADD (de l'anglès, *Fas-associated DD*) o TRADD (de l'anglès, *TNF receptor-associated DD*) (Figura I29).



**Figura I29. Complexes de senyalització dels DRs dependents de FADD i TRADD.** FADD i TRADD formen diferents complexes de senyalització que coordinen vies anti- i pro-apoptòtiques *downstream* dels DRs. a) Quan FADD s'uneix al DR, forma el DISC juntament amb caspasa-8 o -10. La quantitat de caspasa-8 activa generada en cèl·lules de tipus I és suficient per activar les caspases efectores i l'apoptosis. En canvi, les cèl·lules de tipus II necessiten una amplificació de la senyal que es produeix a través de la mitòcondria quan caspasa-8 processa Bid en la seva forma activa, tBid, que transloca a mitòcondria. b) La senyalització de TRADD està ben caracteritzada pel TNF-R1. TRADD forma un complex que conté RIP1, TRAF2 o TRAF5, cIAP1 i cIAP2, que activa diversos gens a través dels factors de transcripció NF-κB i AP-1. Font: (Wilson, Dixit *et al.* 2009).

De forma general, FADD controla la mort cel·lular a través del reclutament de les pro-caspases-8 o -10. En canvi, TRADD controla altres funcions no apoptòtiques a través del reclutament de tres molècules: RIP1, (de l'anglès, *receptor-interacting protein-1*) que és una quinasa que conté un DD (Festjens, Vanden Berghe *et al.* 2007), TRAF2 (de l'anglès, *TNF receptor-associated factor 2*) i cIAPs (Varfolomeev and Vucic 2008).

Els DRs poden ser dividits en dues categories segons la proteïna adaptadora que uneixen. CD95, TRAIL-R1 i TRAIL-R2 uneixen a FADD i principalment promouen l'apoptosi (Figura I29a). Per contra, TNF-R1 i DR3 uneixen TRADD i promouen principalment activació del sistema immunitari i inflamació (Figura I29b) (Ashkenazi 2002). El DR6 pot unir-se a TRADD quan aquest està sobre-expressat (Pan, Bauer *et al.* 1998), fins fa poc temps la seva senyalització era desconeguda i, recentment, s'ha d'escrit que podria estar associat amb l'Alzheimer (Nikolaev, McLaughlin *et al.* 2009). Existeix una relació entre les senyalitzacions per FADD i TRADD. Així, TNF-R1 pot induir apoptosi a través del reclutament de FADD i caspasa-8 a través del DD de TRADD (Micheau and Tschopp 2003, Wang, Du *et al.* 2008), i TRAIL-R1 i TRAIL-R2 poden activar vies de supervivència a través de l'activació de RIP1 dependent de FADD i caspasa-8 (Varfolomeev, Maecker *et al.* 2005).

### ➤ **Senyalització dels DRs regulada per FADD**

CD95L o TRAIL indueixen apoptosi a través de la via extrínseca de mort. La unió d'un lligand homotrimèric al DR, provoca que els DRs s'agrupin i puguin unir a FADD. FADD recluta a la pro-caspasa-8 o -10 per formar el DISC (de l'anglès, *death-inducing signaling complex*) (Figura I29a) (Ashkenazi and Dixit 1998, Peter and Krammer 2003). El DISC actua com una plataforma que permet l'auto-processament de les pro-caspases-8 o -10 permetent-ne l'alliberació al citosol en la seva forma activa. Les caspases actives -8 o -10 estimulen a les caspases executores -3, -6 i -7, que a la vagada podran processar multitud de substrats que culminaran en la mort cel·lular apoptòtica. En cèl·lules de tipus I (per exemple, timòcits), els esdeveniments descrits anteriorment són suficients per induir apoptosi. En cèl·lules de tipus II (per exemple, cèl·lules B pancreàtiques), és necessari que el mecanisme d'apoptosi sigui amplificat. Així, la caspasa-8 processa la proteïna Bid a la seva forma truncada tBid i això activa



la via intrínseca mitocondrial de mort que s'explicarà més endavant (Figura 129a). La senyalització al DISC també involucra la proteïna cFLIP (de l'anglès, *cellular FLICE inhibitory protein*), que conté dos dominis DEDs (de l'anglès, *death effector domain*). Té dues variants d'*splicing* curtes (cFLIP<sub>S</sub> i cFLIP<sub>R</sub>) i una llarga (cFLIP<sub>L</sub>). cFLIP<sub>S</sub> pot inhibir l'apoptosi induïda pels DRs perquè competeix amb caspasa-8 per unir-se a FADD i, nivells elevats de cFLIP<sub>L</sub>, poden interferir amb el reclutament de les pro-caspases-8 o -10 al DISC (Krueger, Schmitz *et al.* 2001). Per contra, nivells baixos de cFLIP<sub>L</sub> poden formar heterodímers amb pro-caspasa-8 promovent la seva auto-proteòlisi (Micheau, Thome *et al.* 2002, Boatright, Deis *et al.* 2004).

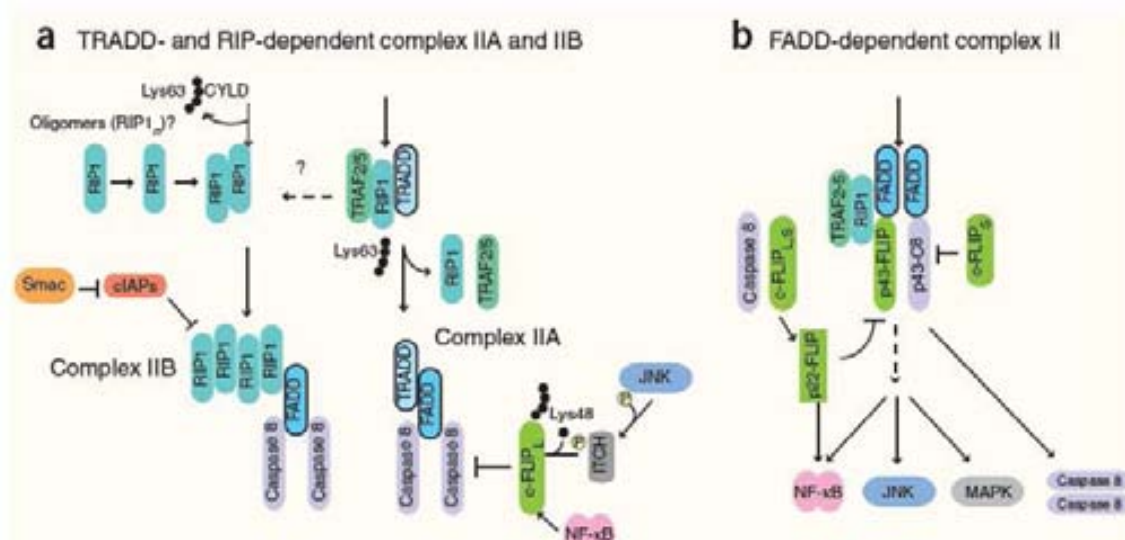
### ➤ **Senyalització dels DRs regulada per TRADD**

TNF $\alpha$  és una citoquina pro-inflamatòria pleiotròpica, produïda principalment pels macròfags i involucrada en moltes funcions biològiques com per exemple proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi (MacEwan 2002). TNF $\alpha$  es sintetitza com una proteïna transmembrana i és alliberada per l'acció de TACE (de l'anglès, *TNF $\alpha$  converting enzyme metalloprotease*). La forma processada de la proteïna, de 17 kDa, és la responsable de tots els processos en els quals la citoquina està involucrada (Wajant, Pfizenmaier *et al.* 2003). Per exercir les seves funcions biològiques, TNF $\alpha$  interacciona amb el TNF-R1 i el TNF-R2, que comparteixen només el 28% d'homologia principalment en la seva porció extracel·lular. La principal diferència estructural entre ambdós receptors és la presència a la part intracel·lular de TNF-R1 del domini DD de 60-80 aminoàcids que és absent en TNF-R2 (Tartaglia, Gimeno *et al.* 1992, MacEwan 2002, Yang, Lindholm *et al.* 2002). Aquest motiu, és essencial per a la interacció i el reclutament de proteïnes requerides per a la transmissió de senyals apoptòtiques. Degut a aquesta diferència, tot i que la senyalització per TNF $\alpha$  pot tenir lloc a través de dos receptors, TNF-R1 i TNF-R2, la majoria dels efectes biològics són a través de TNF-R1 (Grell, Zimmermann *et al.* 1999). D'aquesta manera, TNF-R1 està principalment involucrat en mort cel·lular, mentre que el TNF-R2 està implicat principalment en promoure la supervivència a través de l'activació perllongada de NF- $\kappa$ B. En casos patològics, TNF-R2 pot promoure metàstasi (Chopra, Riedel *et al.* 2013). Així doncs, quan TRADD és reclutat per TNF-R1, es forma l'anomenat complex I a la membrana plasmàtica a través de la

unió de RIP1, TRAF2 (o TRAF5), cIAP1 i cIAP2 (Figura I29b). Aquest complex pot activar les vies de supervivència de NF- $\kappa$ B, JNK i p38 (Varfolomeev and Ashkenazi 2004, Symons, Beinke *et al.* 2006) que estimulen gens que regulen proliferació, diferenciació, inflamació o apoptosi.

➤ **Complexes citoplasmàtics dels adaptadors del DRs**

A banda de la formació del complex I, l'activació de TNF-R1 pot comportar la formació de dos complexos citoplasmàtics: IIA i IIB (Figura I30a) (Micheau and Tschopp 2003, Varfolomeev and Ashkenazi 2004, Wang, Du *et al.* 2008).



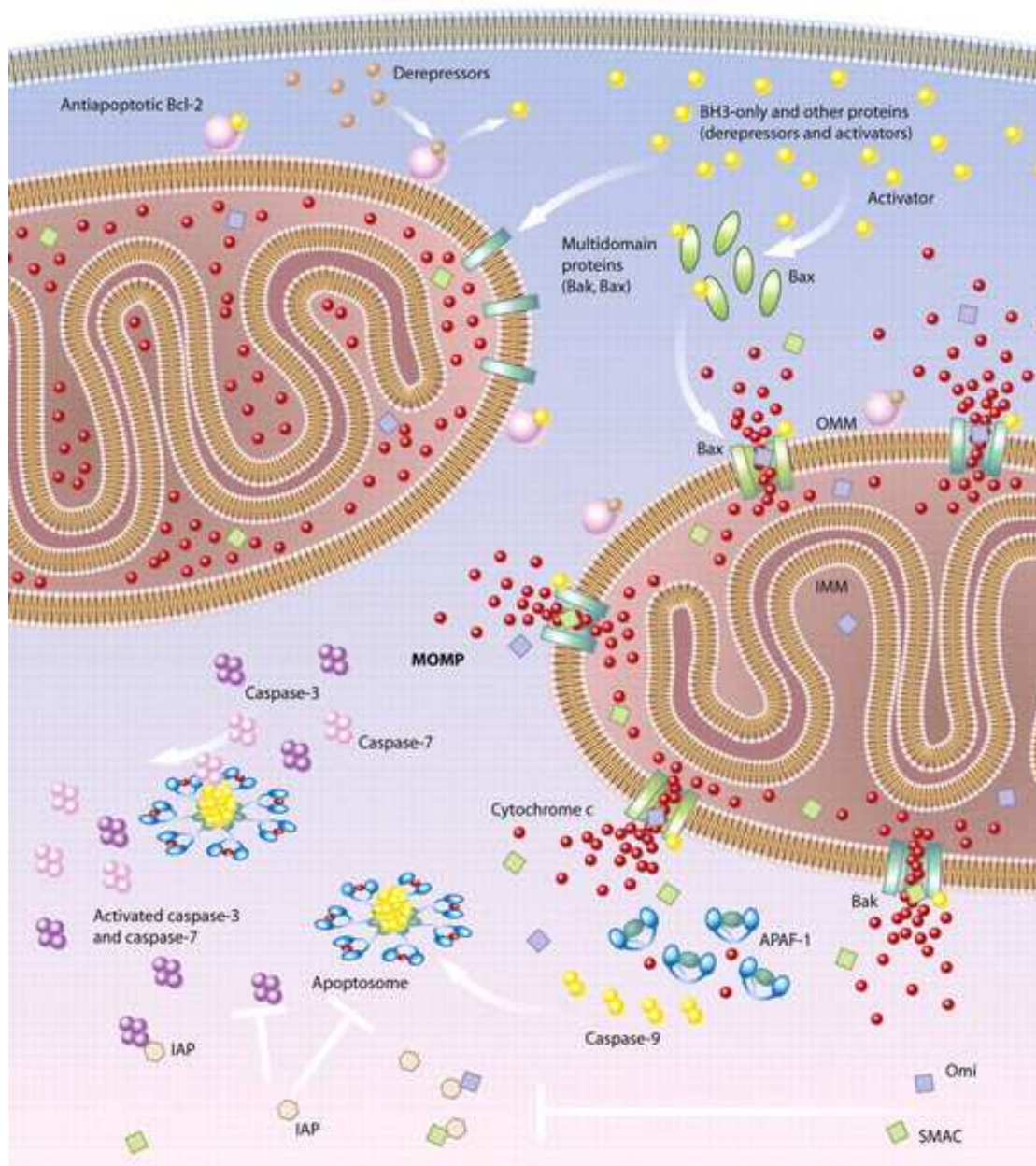
**Figura I30. Complexes de senyalització secundaris dependents de FADD, TRADD i RIP1.** FADD, TRADD i RIP1 poden formar complexos que coordinen vies anti- i pro-apoptòtiques. a) El reclutament de TRADD al TNF-R1 promou la formació del complex IIA, que involucra el reclutament de FADD a través de TRADD i l'activació de caspasa-8. Un complex alternatiu IIB, es forma de manera independent a TRADD a través de RIP1 i FADD i activa a caspasa-8. El complex IIA està regulat per cFLIP i, el IIB, per la ubiquitinització de RIP1 induïda per cIAP i la desubiquitinització de RIP1 induïda per CYLD. La lligasa d'Ubiquitina E3 ITCH, que està regulada per la senyalització de JNK *downstream* del complex I de TNF-R1, regula de forma negativa la quantitat de cFLIP, facilitant així l'activació de caspasa-8 pel complex IIA. Smac / DIABLO facilita la auto-ubiquitinització de cIAP i la seva degradació via proteasoma per l'activació al·lostèrica d'un domini ubiquitina *RING finger* de cIAP, que promou la formació del complex IIB. b) El complex II dependent de FADD activa NF- $\kappa$ B i MAPK i això, promou la secreció de quimioquines i citoquines. Els heterodímers formats entre caspasa-8 i cFLIP poden diferenciar les respostes anti- o pro-apoptòtiques que es puguin donar. P22 i p43 indiquen els fragments processats de cFLIP o caspasa-8 (C8). Font: (Wilson, Dixit *et al.* 2009).

Un cop el receptor s'ha internalitzat, canvis conformacionals en RIP1 i TRAF2 faciliten la seva dissociació de TRADD, permetent que TRADD recluti a caspasa-8 a través de FADD, que al seu torn recluta a cFLIP i així es forma el complex IIA (Schutze, Tchikov *et al.* 2008, Wang, Du *et al.* 2008) (Figura I30a). Quan RIP1 s'associa amb TRADD al complex I, RIP1 es modifica amb una poliubiquitinització de la Lys63, però en canvi, en el complex IIB no es troba ubiquitinat. L'enzim que desubiquitinitza RIP1 és CYLD (de l'anglès, *cylindromatosis gene product*), i la desubiquitinització és necessària perquè caspasa-8 es pugui activar al complex IIB (Wang, Du *et al.* 2008), fet que suggereix que la desubiquitinització de RIP1 permetria la seva oligomerització i unió a FADD. El fet que TRADD i TRAF2 no formen part del complex IIB (Wang, Du *et al.* 2008), i que el silenciament de TRADD augmenta la formació del complex IIB, implicaria que RIP1 és un adaptador alternatiu per TNF-R1 (Figura I30b) (Jin and El-Deiry 2006, Zheng, Bidere *et al.* 2006, Pobezinskaya, Kim *et al.* 2008, Wang, Du *et al.* 2008). La contribució específica del complex IIA o IIB a la senyalització pro-apoptòtica de TNF-R1 encara no està clara.

CD95 pot coordinar diverses respostes no apoptòtiques pro-inflamatòries en cèl·lules immunes (Budd, Yeh *et al.* 2006, Peter, Budd *et al.* 2007), com per exemple, producció de quimioquines i citoquines per part dels monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques (Shortman and Naik 2007). L'activació de les vies d'NF- $\kappa$ B i MAPK i el reclutament de cFLIP al DISC podria afavorir la formació d'un complex II que permetria aquestes respostes inflammatòries (Figura I30b) (Budd, Yeh *et al.* 2006, Han, Zhao *et al.* 2008).

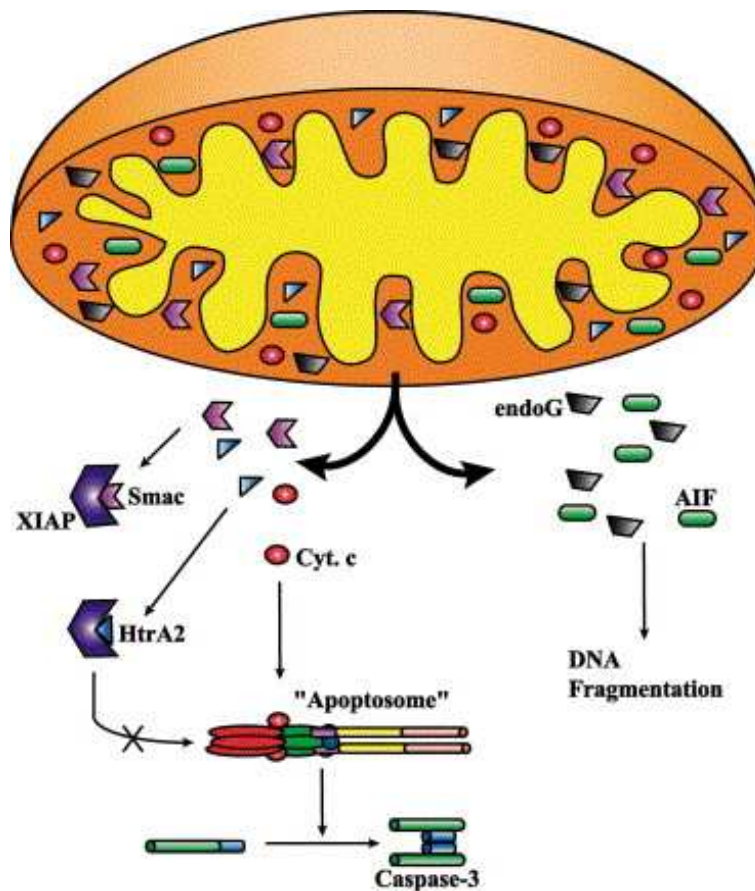
## **7.2. La via intrínseca**

Tal i com s'ha esmentat anteriorment i en la Figura I29, les cèl·lules de tipus II, per transmetre la senyal apoptòtica, necessiten la participació de la mitocondria. Avui en dia, es coneix que la mitocondria conté un gran nombre de molècules que determinaran si la cèl·lula segueix un procés irreversible de mort o no. Les proteïnes clau per a la seva regulació són les proteïnes de la família de Bcl-2 que ja s'han explicat a l'apartat "Proteïnes de la família de Bcl-2".



**Figura 131. La via mitocondrial de l'apoptosi en vertebrats.** En el punt central d'aquesta via trobem el procés de permeabilització de la membrana mitocondrial (MOMP). Aquest procés està regulat principalment pels membres proapoptòtics de la família de Bcl-2, Bax i Bak, i inhibit pels membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2. Les proteïnes *BH3-only* de la família de Bcl-2 regulen MOMP ja sigui activant Bax i Bak (activadors) o antagonitzant les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2 (deregulators). El MOMP permet que les proteïnes que es troben a l'espai intermembrana accedeixin al citosol. L'alliberament de citocrom c activa APAF-1, desencadenant la formació de l'apoptosoma i el reclutament i activació de caspasa-9. Aquesta última, activarà les caspases executores que processaran els seus substrats per tal de dur a terme el procés apoptòtic. Les IAPs inhibeixen l'activació de caspases i la seva inhibició pot ser revertida per antagonistes d'IAPs (per exemple Smac DIABLO i HtrA2 / Omi) que s'alliberen de la mitocòndria quan aquesta es permeabilitza. Modificat de (Spierings, McStay *et al.* 2005).

Diferents estímuls intrínsecs com ara dany a l'ADN, senyals aberrants de receptors de superfície, producció d'espècies reactives d'oxigen o acumulació de proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic, ocasionen l'activació de la via intrínseca mitocondrial. Es descriu com a via intrínseca la senyalització que té com a element principal a la mitocondria i totes les proteïnes que actuen sobre ella, tant pro-apoptòtiques com anti-apoptòtiques, i que regulen la permeabilització de la membrana externa mitocondrial (MOMP, de l'anglès *mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Figura I31).



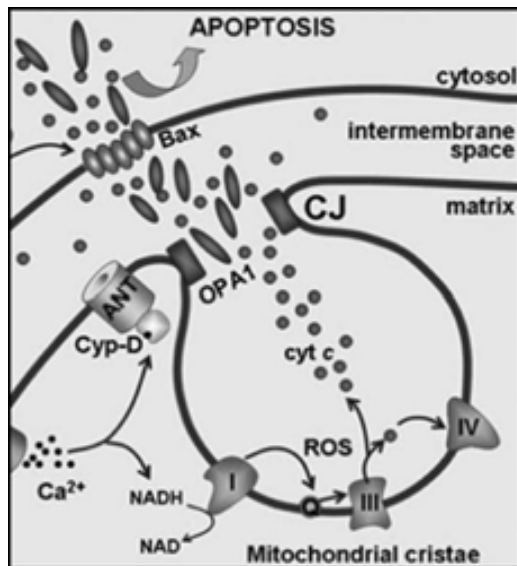
**Figura I32. La ruptura mitocondrial causal l'alliberament de diversos factors apoptogènics.** La disrupció de la membrana mitocondrial causa l'alliberament al citosol de dos principals classes de factors apoptogènics. La primera classe són activadors de caspases, el citocrom c, Smac/DIABLO i Htr2a/omi. El citocrom c, en presència d'ATP o ATP facilita la formació de l'apoptosoma juntament amb APAF-1 i caspasa-9. Smac/DIABLO i Htr2A/Omi, comparteixen un motiu N-terminal que uneix a les IAPs i, d'aquesta manera, exerceixen el seu efecte inhibitor sobre les caspases. Htr2A/Omi també pot induir mort a través de la seva activitat proteolítica. La segona classe de factors, AIF i EndoG, en ser alliberats de la mitocondria transloquen a nucli i causen la degradació del DNA independentment de les caspases. Modificat de (Roberts, Goping et al. 2003).



S'han descrit diferents proteïnes residents en l'espai intermembrana (com per exemple citocrom c, AIF, Omi / HtrA2, Smac / DIABLO i AIF) que són alliberades al citosol després de la permeabilització mitocondrial durant un estímul apoptòtic (Vaux 2011) (Figura I32). Smac / DIABLO ha estat explicat conjuntament amb HtrA2/Omi en detall a l'apartat "Smac/DIABLO i Htr2A/Omi: antagonistes de les IAPs". D'altra banda, l'alliberament de AIF (de l'anglès, *Apoptosis Inducing Factor*) i de la EndoG (de l'anglès, *Endonuclease G*) en resposta a un estímul de mort està associada amb el dany a la mitocòndria (Riedl and Shi 2004). La inducció de l'apoptosi promou la translocació d'AIF de la mitocòndria al nucli, on interacciona amb l'ADN causant-ne la degradació independent de caspases (Daugas, Nochy *et al.* 2000). D'altra banda, l'EndoG alliberat també transloca a nucli on indueix fragmentació oligonucleosomal de l'ADN fins i tot quan les caspases estan inhibides (Garrido and Kroemer 2004) (Figura I32).

### 7.2.1. Formació de l'apoptosoma

Un dels components de l'apoptosoma és el citocrom c. Es tracta d'una proteïna globular hidrofílica d'aproximadament 12 kDa que posseeix un grup hemo i que es troba codificada per un gen nuclear. La seva localització final a la mitocòndria es deu a la translocació a través de la membrana mitocondrial externa per al seu posterior ancoratge a l'enzim "citocrom c hemo liasa" a la cara externa de la membrana mitocondrial interna, on se li incorpora el grup hemo per donar lloc a la proteïna funcional (Mayer, Neupert *et al.* 1995). El citocrom c resideix normalment a les crestes mitocondrials, espais generats degut a la involució de la membrana mitocondrial interna, i es troba segregat de manera efectiva per estretes unions mediades principalment per la proteïna Opa1 (Figura I33). De forma fisiològica, el citocrom c participa en la cadena de transportadors electrònics mitocondrials, utilitzant el seu grup hemo com a intermediari redox per permetre el transport d'electrons entre els complexos III i IV de la cadena que te com a finalitat la producció d'energia en forma de ATP.

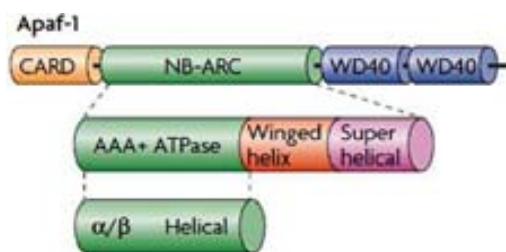


**Figura 133.** Localització mitocondrial del citocrom c i la seva sortida al citosol induïda per un estímul apoptòtic Modificat de (Zhang, Lu et al. 2008).

Quan la cèl·lula detecta l'existència d'un estímul apoptòtic el citocrom c és alliberat al citosol. Sembla que l'alliberament ocorre en dues fases: mobilització i translocació a través de la membrana externa mitocondrial. En cèl·lules no estimulades, una proporció important de citocrom c present a la mitocòndria es troba associat amb cardiolipina (Kalanxhi and Wallace 2007). Els esdeveniments bioquímics requerits per a l'alliberament del citocrom c de la membrana mitocondrial interna encara no estan definits. S'ha suggerit que el seu èxode de les estretes unions *cristae* podria implicar la remodelació d'aquestes, per posteriorment ser translocat a través de la membrana mitocondrial externa (Scorrano, Ashiya *et al.* 2002). Aquesta última correspon a la segona fase de l'alliberament del citocrom c. La major part de les dades existents, indiquen que aquesta translocació involucra una difusió passiva a través dels porus formats durant l'apoptosi en la membrana mitocondrial externa, atès que un gran nombre de proteïnes són alliberades de manera simultània des de l'espai intermembrana durant l'apoptosi (Munoz-Pinedo, Guio-Carrion *et al.* 2006). La membrana mitocondrial externa usualment no és permeable a les proteïnes i, per tant, l'esdeveniment decisiu per a la translocació citosòlica de les molècules pro-apoptòtiques mitocondrials és la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (Chipuk, Bouchier-Hayes *et al.* 2006, Kroemer, Galluzzi *et al.* 2007).

Un altre dels components de l'apoptosoma és Apaf-1 (de l'anglès, *Apoptosi protease-activating factor-1*). Aquesta molècula, com hem vist anteriorment, és l'homòleg en mamífers superiors de CED-4 de *C.elegans*. És

una proteïna amb multidominis de 139 kDa que està constituïda per tres regions funcionals (Figura I32): un domini CARD N-terminal, un domini d'unió a nucleòtid i oligomerització, (NOD/NB-ARC, de l'anglès, *nucleotide-binding and oligomerization domain*) i una zona rica en residus triptòfan i aspàrtic (dominis de repeticions WD40) a la part C-terminal de la proteïna. La funció del domini CARD d'Apaf-1 és la d'unir-se al domini CARD de pro-caspassa-9 mitjançant una interacció homotípica provocant, d'aquesta manera, el reclutament de la caspassa. Els motius WD40 es troben organitzats en dos dominis i són el lloc d'unió del citocrom c (Hu, Ding *et al.* 1998). A diferència d'Apaf-1, en *C.elegans* no s'ha trobat una molècula similar a citocrom c de mamífers. La regió NOD/NB-ARC es troba localitzada entre el CARD i els dominis repetits WD40. Aquesta regió és el centre d'oligomerització i per tant de formació de l'apoptosoma. Estudis estructurals han permès establir que la regió NOD/NB-ARC està composta per un domini ATPasa, seguit d'un domini *Winged-helix* (present en proteïnes d'unió a l'ADN) i un domini superhelicoidal (Riedl, Li *et al.* 2005) (Figura I34).



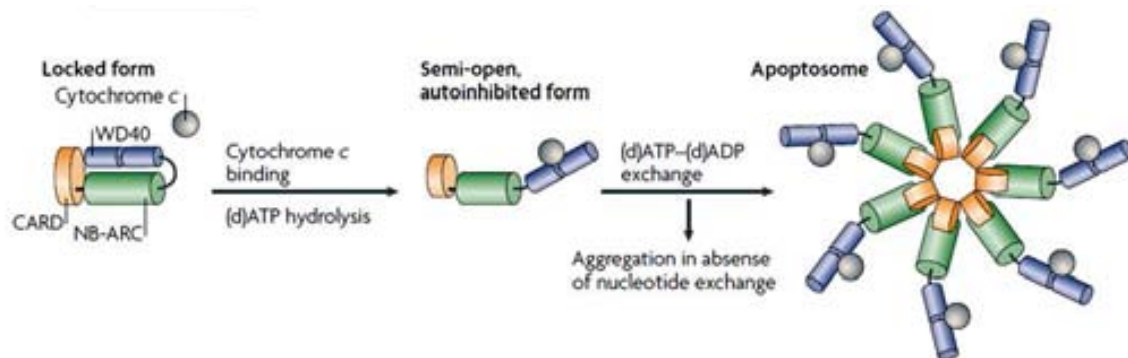
**Figura I34. Estructura d'Apaf-1.** Apaf-1 es pot dividir en tres unitats funcionals: el domini CARD, responsable del reclutament de caspassa-9, el domini d'oligomerització i unió a nucleòtid (NB-ARC) i la regió WD40 que permet la unió del citocrom c. El domini NB-ARC consisteix en una regió ATPasa (organitzada en un domini  $\alpha / \beta$  i helicoidal), seguida d'un domini *Winged-helix* i superhelicoidal (Font: (Riedl and Salvesen 2007)).

En absència d'un estímul apoptòtic Apaf-1 existeix en forma monomèrica. Es creu que en aquesta forma, els dominis WD40 es pleguen cap enrere sobre la resta d'Apaf-1 i el mantenen en un estat tancat auto-inhibit (Figura I35). En aquest estat, Apaf-1 es troba unit a dATP (Saleh, Srinivasula *et al.* 1999). Un cop s'allibera el citocrom c al citosol, aquest s'uneix a la regió WD40 d'Apaf-1, alliberant el tancament de la forma auto-inhibida d'Apaf-1. Aquest és l'esdeveniment crucial mitjançant el qual Apaf-1 és capaç de detectar la senyal apoptòtica. Tot i que el tancament ha estat alliberat, les regions CARD i



NOD/NB-ARC continuen estant en la seva conformació autoinhibida, la forma semi-oberta d'Apaf-1. En aquesta, el domini CARD interacciona de manera íntima amb els dominis ATPasa i *Winged-helix* de la regió NOD/NB-ARC. Aquesta interacció provoca que el domini CARD no es trobi accessible i que, per tant, no sigui capaç de reclutar pro-caspasa-9 (Qin, Srinivasula *et al.* 1999). De la mateixa manera, el bloqueig del domini ATPasa obstaculitza la possibilitat d'Apaf-1 de formar oligòmers. Com s'ha esmentat anteriorment, dATP es troba unit a Apaf-1 en el seu estat tancat, previ a la unió del citocrom c. S'ha vist que la unió del citocrom c provoca la hidròlisi d'dATP a dADP. Tot i això, Apaf-1 roman en el seu estat autoinhibit amb dADP unit (Riedl, Li *et al.* 2005). En aquest punt, l'esdeveniment clau per a la formació de l'apoptosoma consisteix en l'intercanvi del nucleòtid dADP per dATP, per part de la ATPasa, provocant els canvis conformacionals requerits per a la formació de l'oligòmer (Kim, Du *et al.* 2005). Aquest esdeveniment té com a finalitat el d'evitar una formació accidental de l'apoptosoma com podria succeir en alliberar citocrom c durant la fissió o, fins i tot, la fusió mitocondrial. En el cas que l'apoptosoma no es formi, es produirà la seva degradació o la formació d'agregats inactius. A través de crio-microscopia electrònica s'ha vist que l'apoptosoma consisteix en set molècules d'Apaf-1 que es troben distribuïdes formant una estructura semblant a una roda. Les regions WD40 unides al citocrom c s'estenen cap a fora en forma de raigs, mentre que el domini CARD i la regió NOD/NB-ARC de cada molècula d'Apaf-1, s'ubiquen al centre de la roda. Aquest acoblament provoca un arranament circular dels dominis CARD que resulta clau per al reclutament i activació de caspasa-9 (Riedl and Salvesen 2007). El complex que es forma aconsegueix pesos moleculars de 700 kDa i 1,4 MDa (Srinivasula, Ahmad *et al.* 1998, Zou, Li *et al.* 1999), sent el primer d'ells el que posseeix activitat biològica, mentre que el major pes molecular resulta ser inactiu (Cain, Bratton *et al.* 2000). S'han descrit dues hipòtesis sobre el mecanisme d'activació de caspasa-9. La primera hipòtesi, es tracta d'un model al·lostèric, en el qual el monòmer és activat directament per l'apoptosoma (Rodriguez and Lazebnik 1999). La segona hipòtesi, és la que s'ha descrit anteriorment per les caspases iniciadores, segueix un model d'activació induït per proximitat en el qual l'apoptosoma proporciona una plataforma per a la dimerització de caspasa-9 (Boatright,

Renatus *et al.* 2003). Aquest segon model sembla més atractiu ja que pot ser aplicat a diverses plataformes de senyalització i a les seves dianes.



**Figura I35. Mecanisme de formació de l'apoptosoma.** Veure explicació en el text (Font: (Riedl and Salvesen 2007)).

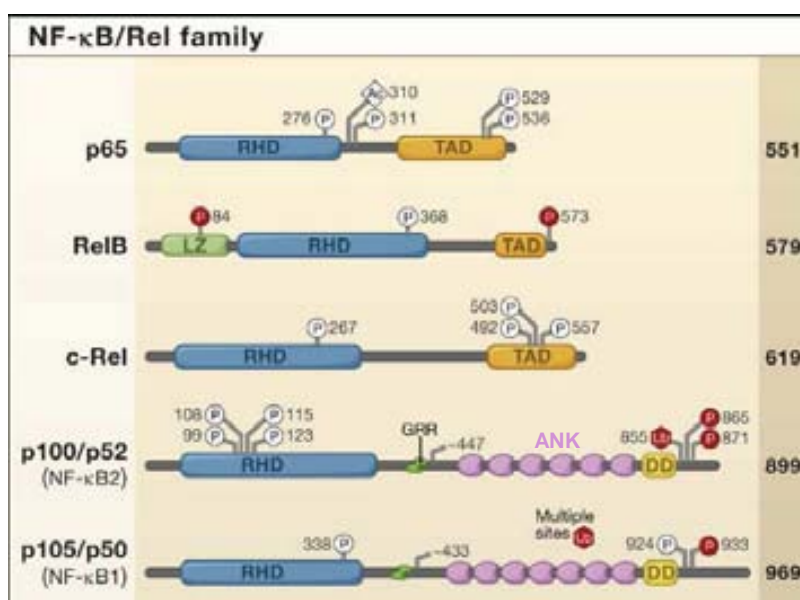
## 8. Altres vies de senyalització anti-apoptòtica: NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappaB*)

NF- $\kappa$ B és un factor de transcripció crític involucrat en un gran ventall de processos biològics que inclouen respostes immunològiques, supervivència cel·lular, respostes a l'estrès i maduració de diversos tipus cel·lulars. Es coneix que l'activació de NF- $\kappa$ B provoca la seva unió a seqüències d'ADN diana específiques i regula la transcripció d'aproximadament uns 500 gens involucrats en immunoregulació, regulació del creixement, inflamació, carcinogènesi i apoptosi (revisat a (Gupta, Sundaram *et al.* 2010)). Mentre que l'activació de NF- $\kappa$ B és necessària per protegir els organismes de danys ambientals, en diverses malalties s'observa una disregulació de la seva activitat com per exemple en inflamació crònica i càncer (revisat a (Shih, Tsui *et al.* 2011)). Per aquest motiu, entendre la regulació i senyalització de NF- $\kappa$ B és important en termes de salut humana.

### 8.1. Proteïnes de la via de transducció de senyal de NF- $\kappa$ B

En mamífers, la família de NF- $\kappa$ B està composta per cinc factors de transcripció: p50, p52, p65/RelA, c-Rel, i RelB (Figura I36). Aquests factors de transcripció comparteixen un domini N-terminal de dimerització i d'unió a l'ADN, conegut com a RHD (de l'anglès, *Rel homology domain*), a través del qual poden

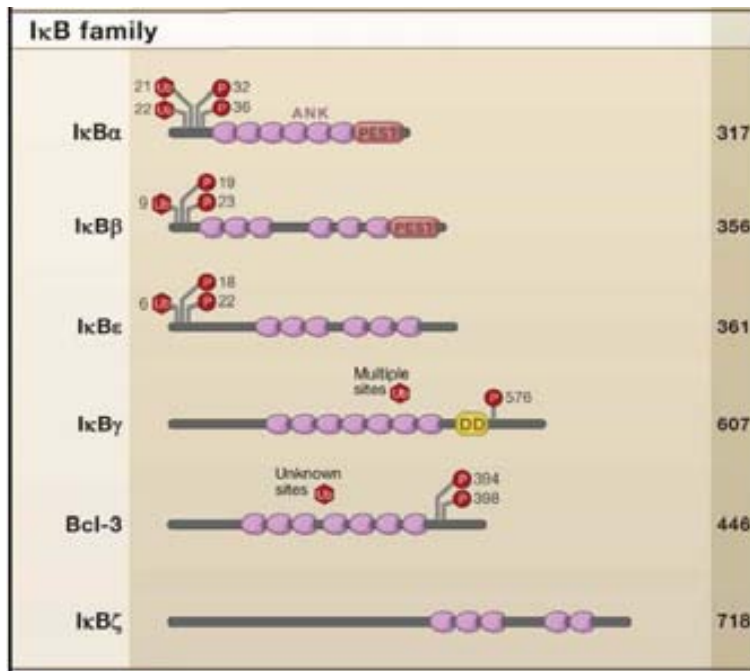
formar homo i heterodímers. Els dímers d'NF- $\kappa$ B poden unir-se a un gran nombre de seqüències diana presents en l'ADN que s'anomenen llocs  $\kappa$ B i modular així l'expressió gènica. RelB, c-Rel, i p65 contenen en el seu extrem C-terminal els dominis TAD (de l'anglès, *Transcription activation domains*) que són capaços de reclutar a co-activadors i activar la transcripció gènica dels gens diana (Figura I36). A diferència de RelB, c-Rel i p65, els factors p50 i p52 no tenen dominis TAD, però poden activar la transcripció gènica formant heterodímers amb p65, c-Rel o RelB, o reclutant altres proteïnes que continguin dominis TAD. De totes maneres, com a homodímers no poden activar la transcripció *per se* però si que poden reprimir la transcripció per mitjà de la seva unió a l'ADN (Shih, Tsui *et al.* 2011).



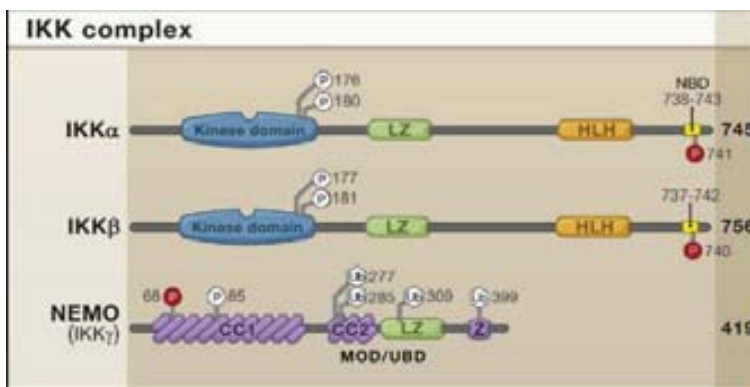
**Figura I36. Proteïnes de la família d'NF- $\kappa$ B.** Modificat de (Hayden and Ghosh 2008).

En la majoria de cèl·lules, els complexos d'NF- $\kappa$ B són inactius i resideixen principalment al citoplasma acomplexats amb les anomenades proteïnes inhibidores I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\zeta$ , Bcl3, I $\kappa$ B $\zeta$ , Figura I37) o bé amb les proteïnes precursors p100 i p105. Totes elles tenen en comú la seva estructura tridimensional i es distingeixen pel nombre de repeticions dels dominis d'ankerina responsables de la interacció amb el dímer d'NF- $\kappa$ B (Baeuerle 1998). La unió de les proteïnes I $\kappa$ B amb els dímers d'NF- $\kappa$ B oculta una de les dues seqüències NLS (de l'anglès, *Nuclear Localization Sequence*) i és per aquest motiu, que cal que el dímer es dissociï de l'inhibidor per poder-se translocar a nucli (Luque and Gelinas 1998). Quan les vies de senyalització s'activen, les proteïnes I $\kappa$ B es

degraden i els dímers d'NF- $\kappa$ B entren al nucli per modular l'expressió gènica dels gens diana. En la majoria de casos, hi ha un pas comú en aquest procés mediat pel complex I $\kappa$ B kinasa (IKK) que fosforila I $\kappa$ B, marcant-lo així per a ser degradat pel proteassoma (Chen, Hagler *et al.* 1995, Ghosh, May *et al.* 1998, Hayden and Ghosh 2008). El complex IKK consisteix en dues kinases catalítiques actives, IKK $\alpha$  (IKK1) i IKK $\beta$  (IKK2) i una proteïna reguladora, NEMO o IKK $\gamma$  (de l'anglès, *NF- $\kappa$ B essential modifier*) (Figura I38).



**Figura I37. Proteïnes de la família d'I- $\kappa$ B.** Modificat de (Hayden and Ghosh 2008).

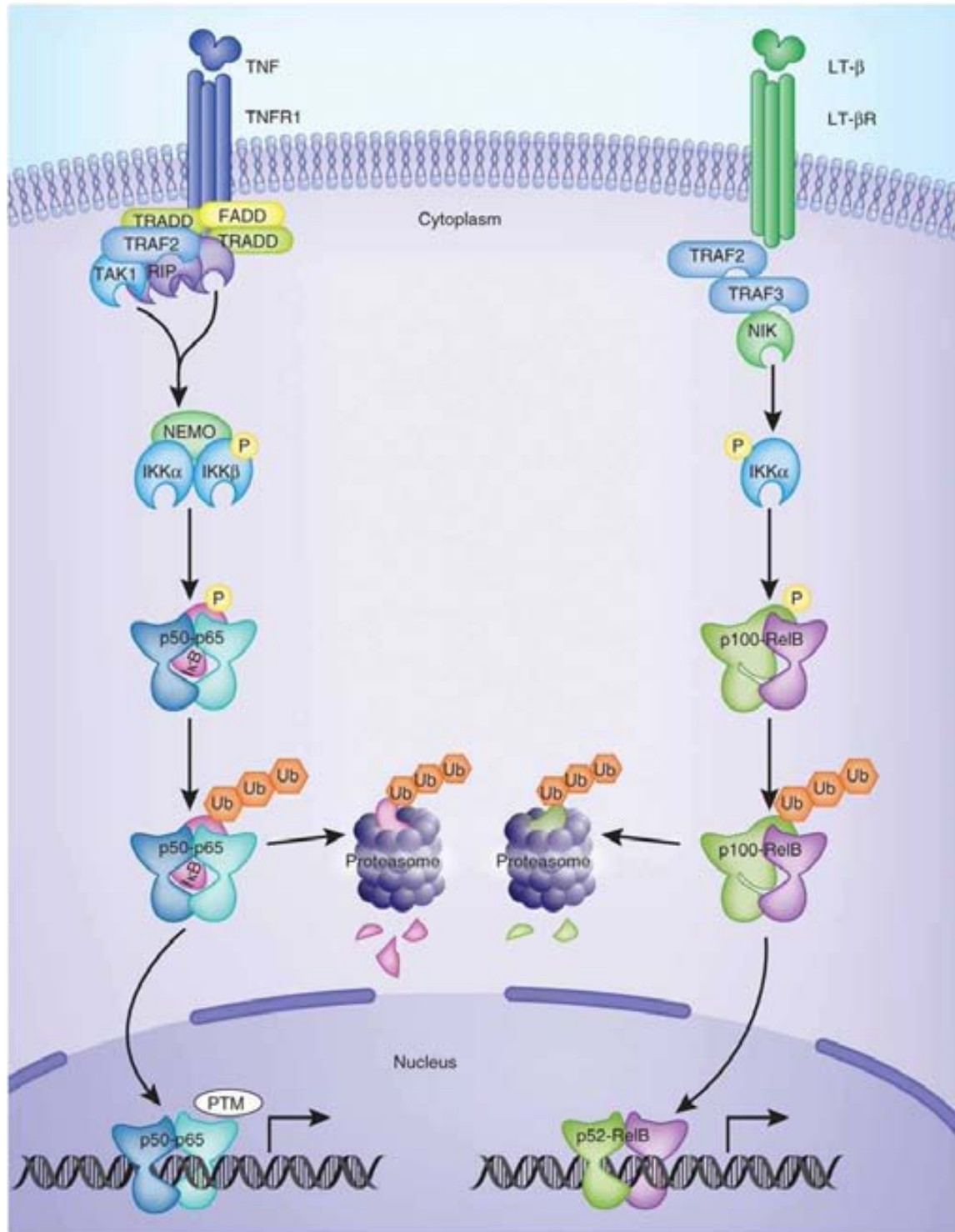


**Figura I38. Proteïnes de la família d'IKK.** Modificat de (Hayden and Ghosh 2008).

Existeix una gran complexitat en la manera en que les proteïnes principals en la via d'NF- $\kappa$ B funcionen individualment i com són capaces de coordinar-se.

## 8.2. Senyalització de la via de NF- $\kappa$ B

Existeixen dues vies d'activació d'NF- $\kappa$ B, la via canònica i la no canònica (Lin, Bai *et al.* 2010) (Figura I39).



**Figura I39.** Vies canònica (esquerra) i no canònica (dreta) d'activació de NF- $\kappa$ B. (Veure text per més detalls). Font: (Oeckinghaus, Hayden *et al.* 2011).

**La via canònica** (Figura I39) és la via predominant en la majoria de tipus cel·lulars. Normalment, és activada per citoquines proinflamàtòries com IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , així com per una varietat de factors que causen estrès cel·lular (Hayden and Ghosh 2004). L'estímul més estudiat que representa a la via canònica és TNF $\alpha$  i s'utilitzarà d'exemple. Així doncs, la via s'inicia amb la unió de la citoquina al seu receptor (TNFR) que recluta IKK al complex de senyalització de TNFR1 a través de TRAF2 i de RIP1: les *E3 ubiquitin ligases* cIAP-1 i cIAP-2 ubiquitinen a RIP1 i això permet la unió de IKK. IKK s'activa per mitjà d'una fosforilació mediada per RIP1 que involucra MEKK3 (de l'anglès, *MAPK kinase kinase 3*) o TAK1 (de l'anglès *TGF- $\beta$ -activated kinase 1*) (Devin, Cook *et al.* 2000, Chen 2005). Posteriorment, la subunitat catalítica activada IKK $\beta$  fosforila els residus de serina de les posicions 32 i 36 d'I $\kappa$ B, de manera que es poliubiquitina i es degrada ràpidament al proteassoma. Aquest procés exposa el senyal NLS de p65 i p50, assegurant la translocació nuclear d'NF- $\kappa$ B que promourà la transcripció gènica. A més a més, l'activitat transcripcional d'NF- $\kappa$ B és regulada també per fosforilació i acetilació de la subunitat p65, afectant així la seva interacció amb co-activadors transcripcionals com CBP/p300 (Hayden and Ghosh 2004). D'altra banda, a través de les ATMs (de l'anglès, *ataxia telangiectasia mutated*), que són kinases sensores de dany en l'ADN, NEMO/IKK $\gamma$  es fosforila i és reclutat per formar el PIDDossoma, (format per RIP1, PIDD (de l'anglès *p-53 induced death domain*) i NEMO) dins el nucli, on RIP1 indueix l'activació de NEMO (Janssens, Tinel *et al.* 2005, Wu, Mabb *et al.* 2005, Festjens, Vanden Berghe *et al.* 2007). Així doncs, NEMO és fosforilat per ATM i migra del nucli al citoplasma, on uneix a IKK $\beta$ . És llavors quan IKK $\beta$  s'escindeix causant la degradació de les I $\kappa$ B, iniciant la via canònica d'activació d'NF- $\kappa$ B (Janssens, Tinel *et al.* 2005, Wu, Mabb *et al.* 2005, Wu, Conze *et al.* 2006, Festjens, Vanden Berghe *et al.* 2007). La **via no canònica** (Figura I39) s'activa per receptors de la família de receptors de TNF que no són de mort, com CD40, limfocina beta (LT $\beta$ ) i BAF (de l'anglès, *B-cell activating factor*), i algunes proteïnes virals com LMP-1 provinent del virus de l'Epstein-Barr (EBV). Aquesta via és dependent de l'activació de IKK $\alpha$  per NIK (de l'anglès, *NF- $\kappa$ B-inducing kinase*), que promou el tall de la forma precursora p100 per formar p52. Llavors, p52 forma un complex funcional amb RelB i es transloca al nucli per induir expressió gènica (Hayden and Ghosh 2004). Les proteïnes cIAP que



promouen la via canònica, en aquest cas juguen un paper negatiu, ja que promouen la ubiquitinització i degradació de NIK (Zarnegar, Wang *et al.* 2008). Així doncs, en determinades circumstàncies, les vies canònica i no canònica podrien estar coordinades.

En alguns casos, altres vies anomenades **vies atípiques** poden activar NF-κB a més a més de l'activació produïda per les vies canònica i no canònica. Per exemple, la llum ultraviolada d'ona curta causa l'activació d'NF-κB independentment de les IKKs i això involucra la fosforilació de CK2 (de l'anglès, *casein kinase-2*) i la degradació de IκB depenent de calpaines (Kato, Delhase *et al.* 2003). També, el peròxid d'hidrògen s'ha demostrat que pot activar NF-κB a través de la fosforilació de tirosines (Tyr42) d'IκB (Tergaonkar, Bottero *et al.* 2003, Viatour, Merville *et al.* 2005).

### 8.3. Models murins per a l'estudi de la funcionalitat de NF- κB

Els ratolins *knockout* (simples i dobles) per als diferents gens implicats en la via de NF-κB han permès estudiar la implicació de cada un d'ells en els processos fisiològics modulats per aquest factor de transcripció en diferents tipus cel·lulars. En la taula I3 es mostra un recull d'aquests models i dels seus fenotips.

**Taula I3. Models murins per a l'estudi de de la funcionalitat de NF- κB**

<b>Ratolí knockout</b>	<b>Fenotip</b>	<b>Referència</b>
P65/RelA	Letal embrionari a E15-16; apoptosi hepàtica, sensibilitat a TNFα	(Pasparakis, Luedde <i>et al.</i> 2006)
RelB	Defectes en la immunitat innata i adquirida; infiltració de cèl·lules T en òrgans; inflamació de la pell	(Okada, Urakami <i>et al.</i> 1992, Burkly, Hession <i>et al.</i> 1995, Weih, Carrasco <i>et al.</i> 1995)
c-Rel	No s'activen les cèl·lules T i B; resistència sistèmica a l'artritis	(Kontgen, Grumont <i>et al.</i> 1995, Grumont, Rourke <i>et al.</i> 1998, Campbell, Gerondakis <i>et al.</i> 2000)
P100/p50 (NF-κB1)	Defectes en la resposta immune; resistència a l'artritis; degeneració neuronal; irregularitats en el son	(Sha, Liou <i>et al.</i> 1995, Campbell, Gerondakis <i>et al.</i> 2000, Jhaveri, Ramkumar <i>et al.</i> 2006, Lu, Yu <i>et al.</i> 2006)

p105/p52 (NF- $\kappa$ B2)	Desenvolupament normal; anormalitat en el desenvolupament dels ganglis limfàtics; defectes en la resposta de les cèl·lules T	(Caamano, Rizzo <i>et al.</i> 1998, Franzoso, Carlson <i>et al.</i> 1998, Beinke and Ley 2004)
I $\kappa$ B $\alpha$	Letal neonatal temprà; dermatitis inflamatòria; granulocitosi	(Beg, Sha <i>et al.</i> 1995, Klement, Rice <i>et al.</i> 1996)
I $\kappa$ B $\epsilon$	Reducció en el nombre de cèl·lules T CD44-CD25+	(Memet, Laouini <i>et al.</i> 1999)
Bcl-3	Defectes en la resposta a antigens de cèl·lules B i T	(Franzoso, Carlson <i>et al.</i> 1997, Schwarz, Krimpenfort <i>et al.</i> 1997)
IKK $\alpha$	Moren el dia després de néixer; defectes a la pell	(Hu, Baud <i>et al.</i> 1999, Takeda, Takeuchi <i>et al.</i> 1999)
IKK $\beta$	Letal embrionari a E12,5-13,5; apoptosi hepàtica; sensibilitat a TNF $\alpha$ ; supervivència condicional de les cèl·lules B)	(Li, Van Antwerp <i>et al.</i> 1999, Takeda, Takeuchi <i>et al.</i> 1999, Li, Omori <i>et al.</i> 2003)
IKK $\gamma$ (NEMO)	Letal embrionari a E10-13; apoptosi hepàtica; sensibilitat a TNF $\alpha$ ; desenvolupament de les cèl·lules T i B irregular; augment en apoptosi de cèl·lules B	(Makris, Godfrey <i>et al.</i> 2000, Rudolph, Yeh <i>et al.</i> 2000)
<b>Ratolí doble knockout</b>	<b>Fenotip</b>	<b>Referència</b>
IKK $\alpha$ /IKK $\beta$	Letal embrionari a E12,5; apoptosi hepàtica; sensibilitat a TNF $\alpha$ ; defectes neurals	(Li, Estepa <i>et al.</i> 2000)
p50/p52	Creixement disminuït; anormalitats craneo facials; defectes als ossos: defectes en cèl·lules B	(Franzoso, Carlson <i>et al.</i> 1997, Iotsova, Caamano <i>et al.</i> 1997)
c-rel/p50	Defectes en el sistema immune més greus que en els mutants individuals	(Pohl, Gugasyan <i>et al.</i> 2002)
RelB/p50	Letal 3-4 setmanes després de néixer; s'incrementa la inflamació en els òrgans	(Weih, Durham <i>et al.</i> 1997)
RelA/p50	Letal embrionari a E13; defectes en el desenvolupament de cèl·lules B	(Horwitz, Scott <i>et al.</i> 1997)
c-Rel/RelA	Letal embrionari aproximadament a E13; apoptosi hepàtica; augment en els granulòcits; inhibeixen el cicle cel·lular de cèl·lules T	(Grossmann, Metcalf <i>et al.</i> 1999, Gugasyan, Voss <i>et al.</i> 2004)

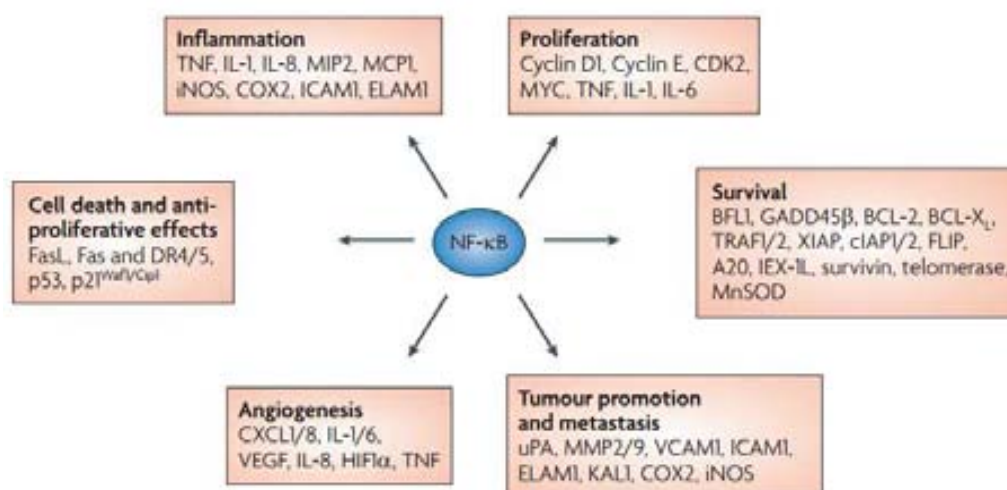
#### 8.4. NF- $\kappa$ B com a diana terapèutica

Induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals és un dels principals objectius de la quimioteràpia i la radioeràpia anticàncer. NF- $\kappa$ B i les seves senyals



activadores contribueixen de forma important a la tumorigènesi en diversos tipus de càncers com el limfoma, la leucèmia, el els càncers de mama i d'ovari. Això és degut a la seva habilitat de regular l'expressió i / o la funció d'oncogens, factors de creixement involucrats en la progressió tumoral i factors que afecten a la resistència a la quimioteràpia (proteïnes antiapoptòtiques, kinases mitòtiques i repressors transcripcionals) (Figura I40) (Barkett and Gilmore 1999, Rayet and Gelinas 1999, Aggarwal 2004, Nakanishi and Toi 2005, Baud and Karin 2009).

A més, s'estima que aproximadament el 15 – 20 % dels càncers humans estan estretament lligats a la inflamació (Kuper, Adami *et al.* 2000). L'activació recíproca entre NF-κB i les citokines inflammatòries, fa que NF-κB sigui un factor important no només per a la inflamació, sinó també per al desenvolupament del càncer (Figura I40).



**Figura I40.** Alguns dels gens diana de NF-κB involucrats en desenvolupament i progressió del càncer. Modificat de (Baud and Karin 2009).

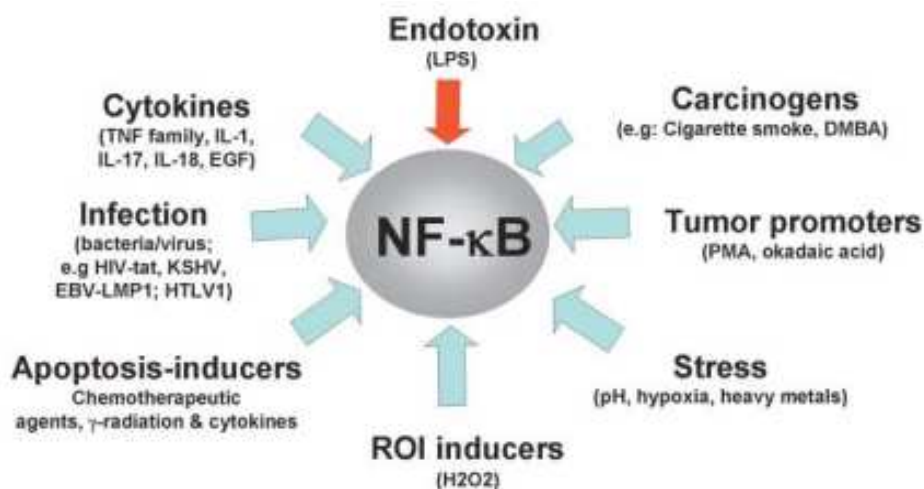
NF-κB està activat constitutivament en molts càncers (veure Quadre I1, adaptat de (Basseres and Baldwin 2006)) i, a més a més, els agents quimioterapèutics i la radiació també poden provocar-ne l'activació (Figura I41), com per exemple el carcinogen benzo[a]pirè que és capaç d'activar NF-κB en part a través de l'acció autocrina de TNFα (Podechard, Lecreur *et al.* 2008).

**Quadre 11. Càncers humans que han estat relacionats amb una activació constitutiva de NF-κB.** (Adaptat de (Basseres and Baldwin 2006)).

Malalties hematològiques. Mieloma múltiple, limfoma de cèl·lules del mantell, limfoma MALT, limfoma difús de cèl·lules B grans, limfoma de Hodgkin, síndrome mielodisplàsic, leucèmia de cèl·lules T d'adult (HTLV-1), leucèmia limfocítica aguda, leucèmia mieloide aguda, leucèmia limfocítica crònica i leucèmia mieloide crònica.

Tumors sòlids. Càncers de: mama, cervical, pròstata, renal, pulmó, còlon, fetge, pàncrees, esòfag, gàstric, laringe, tiroides, paratiroides, bufeta i ovaris. També, melanoma, cilindroma, carcinoma de cèl·lules escamoses (pell, cap i coll), carcinoma oral, carcinoma endometrial, retinoblastoma i astrocitoma/olinblastoma

Ambdues activacions d'NF-κB, la constitutiva i la que indueix la teràpia, són generalment anti-apoptòtiques i és el principal mecanisme pel qual NF-κB indueix resistència a les teràpies en les cèl·lules cancerígenes. Tenint això en compte, la inhibició d'NF-κB i de les seves kinases inicials en combinació amb fàrmacs citotòxics establerts i radiació terapèutica, sembla una estratègia prometedora per a la teràpia contra el càncer. A més a més, aquesta inhibició podria ser beneficiosa per prevenir que les cèl·lules normals es transformin en malignes i per evitar el creixement descontrolat de les cèl·lules tumorals en l'etapa inicial de la tumorigènesi.

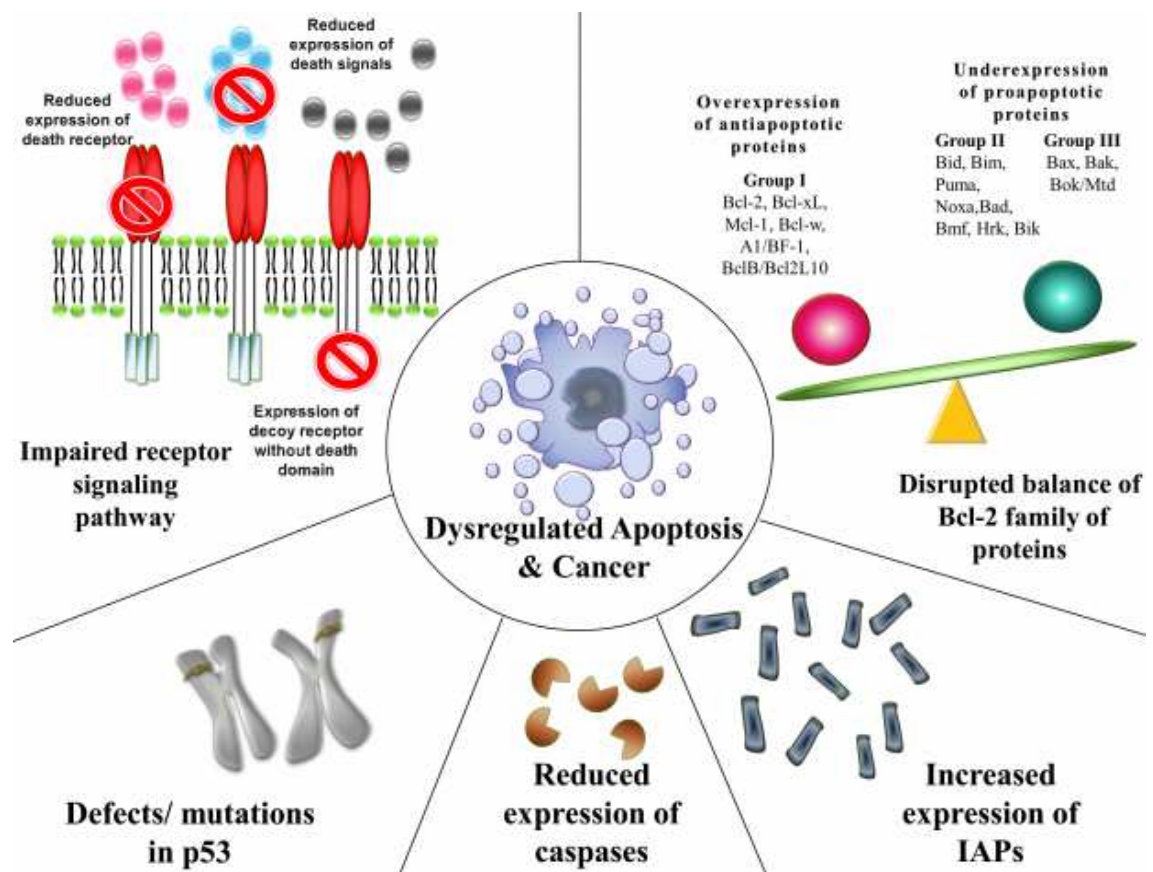


**Figura 141. Inductors d'NF-κB.** Modificat de (Aggarwal 2004).

## 9. Alteració de les vies apoptòtiques en el desenvolupament del càncer

Al principi d'aquesta introducció s'ha explicat, de forma general, que la regulació coordinada de les taxes de proliferació i mort cel·lular és determinant en el manteniment de la homeostàsis cel·lular. És per això que la pèrdua de control d'aquest balanç és un fet central en la formació, progressió i metàstasi del càncer, així com en la resistència adquirida de les cèl·lules tumorals a determinades teràpies anti càncer (Johnstone, Ruefli *et al.* 2002).

Existeixen evidències suficients de que la tumorigènesi no és només resultat d'una proliferació excessiva com a conseqüència de l'activació d'oncogens, sinó que el defecte en les vies apoptòtiques n'és un element clau (Wang 1999, Hanahan and Weinberg 2000) (Figura I42).



**Figura I42.** Mecanismes que contribueixen a l'evasió de l'apoptosi i carcinogènesi. Font: (Wong 2011).

El fet que l'apoptosi és un programa regulat genèticament implica que pot ser disregulat a causa de mutacions i, avui en dia, es coneix que aquestes

mutacions contribueixen en un gran nombre de tumors malignes (Thompson 1995). Una cèl·lula transformada pot adquirir protecció en front a l'apoptosi a través de l'activació inapropiada de proteïnes antiapoptòtiques (que sovint actuen com a oncogens) o bé a través de la inactivació de factors proapoptòtics (que sovint actuen com a supressors de tumors) (Figura 142).

Per exemple, Bcl-2 va ser el primer gen relacionat amb l'apoptosi al qual se li va associar un paper en tumorigènesi. Es troba sobre-expressat en una gran varietat de càncers i contribueix a la supervivència tumoral inhibint directament l'apoptosi (Hockenbery, Nunez *et al.* 1990, Reed 1999). A més a més de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> és un supressor de mort molt potent que es troba sobre expressat en diversos tipus de càncers (Reed 1998). La mutació o disminució dels nivells d'expressió de Bax i Bak és un altre exemple (Rampino, Yamamoto *et al.* 1997, Kondo, Shinomura *et al.* 2000), ja que l'alteració d'aquests gens promou tumorigènesi en ratolins (Yin, Knudson *et al.* 1997). A més a més, la proteïna pro-apoptòtica Bad i la procaspasa-9 estan regulades negativament per la quinasa Akt/PKB oncogènica, que es troba constitutivament activada o amplificada freqüentment en molt tipus de càncers (Nicholson and Anderson 2002) i, el seu antagonista, la fosfatasa PTEN, és un dels supressors de tumors que es troba mutat de forma més comuna en càncer (Yamada and Araki 2001). Akt/PKB també exerceix una altra acció oncogènica important, ja que d'una banda estimula la via d'NF-κB a través de la fosforilació de IKKα i, de l'altra, inhibeix els senyals pro-apoptòtics de p53 a través de la fosforilació de l'oncogen Mdm-2 que, un cop fosforilat, és capaç d'inhibir a p53 (Mayo and Donner 2002). Ambdós, NF-κB i Mdm2, es troben activats de forma inapropiada o sobre-expressats durant el procés de transformació (Orlowski and Baldwin 2002, Chene 2003). p53, una proteïna supressora de tumors que actua com a factor de transcripció, és un dels factors apoptòtics relacionats amb càncer més intensament estudiats ja que es troba inactivat en aproximadament un 50% dels tumors humans (Hainaut and Hollstein 2000). La seva activació comporta l'aturament del creixement cel·lular i / o apoptosi si s'estimula l'expressió de diversos gens diana de p53 com p21, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1, Fas, i DR5 (Vousden and Lu 2002) o si es reprimeix l'expressió de proteïnes anti-

apoptòtiques com Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> o survivina (Wu, Mehew *et al.* 2001, Hoffman, Biade *et al.* 2002).

Amb tots aquests exemples, és possible fer-se una idea de la importància que té la disregulació de l'apoptosi en la progressió tumoral i, en conseqüència, la transcendència que pot tenir el seu estudi alhora de desenvolupar estratègies terapèutiques més efectives, específiques i amb menys efectes secundaris. Algunes d'aquestes estratègies es troben revisades a (Wong 2011). En el cas del càncer, les estratègies podrien anar dirigides a l'activació específica de supressors de tumors pro-apoptòtics o, per contra, a la inhibició d'oncogens anti-apoptòtics (Reed 2002). La identificació de gens i productes gènics que són responsables dels processos apoptòtics, juntament amb la informació emergent de l'estructura i dels mecanismes d'acció d'algunes proteïnes clau en l'apoptosi, fa possible la identificació de nous compostos potencialment terapèutics (Reed 2002).

## **9.1. GBM (glioblastoma multiforme) com a model tumoral de rellevància**

### **9.1.1. Introducció al GBM**

Els gliomes representen més del 50% de tots els tumors cerebrals i són el tipus de tumor cerebral més comú en adults (Adamson, Kanu *et al.* 2009). Anualment, aproximadament unes 13.000 morts s'atribueixen als gliomes i cada any se'n diagnostiquen aproximadament 18.000 casos nous (Schwartzbaum, Fisher *et al.* 2006). Estan classificats segons els criteris de la WHO (de l'anglès, *World Health Organisation*) en quatre graus basats en característiques histològiques, la prognosi i la supervivència. El grau I, correspon als gliomes benignes i els altres tres graus corresponen als anomenats gliomes astrocítics difosos, classificats com a tumors de grau II, III i IV. El Glioblastoma (GBM) està classificat com a grau IV i és el tumor primari més comú del sistema nerviós central (CNS, de l'anglès *Central Nervous System*) als Estats Units i a Europa, amb 3 persones de cada 100.000 diagnosticades de nou cada any. Aquesta xifra, és relativament petita si es compara amb alguns càncers més comuns com el de mama (124 dones de cada 100.000 diagnosticades cada any o pròstata

(166 homes de cada 100.000 diagnosticats cada any (Abrams 2000). Però cal tenir en compte que el percentatge d'èxit en el tractament d'aquests càncers més comuns és molt més alta que en els tumors cerebrals. Els GBMs estan associats a les pitjors prognosis, amb una mitjana de supervivència de menys de 12 mesos i representen aproximadament el 51% de tots els tipus de tumors glials (Figura 143). Estudis poblacionals mostren que la supervivència de pacients diagnosticats amb GBM és del 17 – 30% al cap d'un any, i només del 3- 5% al cap de dos anys, tot i que hagin pogut accedir a les diferents teràpies existents (Capocaccia, Gatta *et al.* 2003, Ohgaki, Dessen *et al.* 2004). Des de fa dècades, és conegut que gliomes de graus més baixos poden tornar a aparèixer, progressar i transformar-se en GBM. Aquests tumors s'anomenen GBMs secundaris, mentre que els GBM que sorgeixen *de novo*, s'anomenen GBMs primaris (Parsons, Jones *et al.* 2008, Yan, Parsons *et al.* 2009).

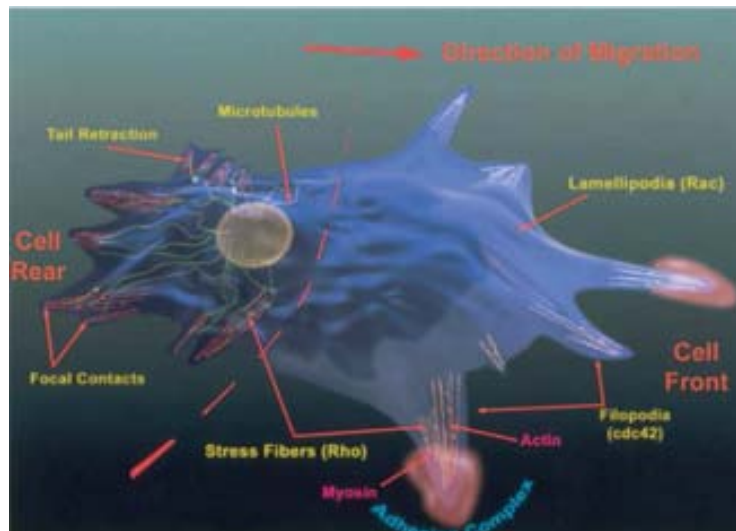
Respecte a l'etiologia del tumor, la teoria que ha estat més acceptada és que la formació del glioma ocorre a través d'un procés de desdiferenciació (a través de mutacions somàtiques) de cèl·lules glials i astròcits normals. De fet, models animals de formació de gliomes rebel·len que els compartiments d'astròcits i de cèl·lules mare creen l'ambient ideal per a la formació i progressió del glioma (Bachoo, Maher *et al.* 2002, Uhrbom, Nerio *et al.* 2004, Hambardzumyan, Squatrito *et al.* 2008, Kwon, Zhao *et al.* 2008, Alcantara Llaguno, Chen *et al.* 2009). La consideració de les cèl·lules mare neurals com a possibles cèl·lules que originen el glioma, ha anat guanyant interès gràcies a la hipòtesi recent de l'existència d'un càncer de cèl·lula mare (en anglès, *cancer stem cell model*). Aquest model, implica que només un petit percentatge de cèl·lules del glioma tenen la capacitat d'auto-renovar-se i diferenciar-se contínuament, ambdues característiques defineixen el que en anglès s'anomena *stemness*. S'han publicat diferents marcadors fenotípics de l'*stemness* (Singh, Clarke *et al.* 2003, Galli, Binda *et al.* 2004, Singh, Hawkins *et al.* 2004, Vescovi, Galli *et al.* 2006, Dell'Albani 2008, Ogden, Waziri *et al.* 2008). És conegut que les cèl·lules mare de glioma són resistents a l'apoptosi induïda per agents anticancerígens com etopòsid, camptotecina, cisplatí, temozolomida, doxorubicina, vincristina i metotrexat a dosis que són tòxiques per poblacions normals de cèl·lules mare (Eramo, Ricci-Vitiani *et al.* 2006). Aquestes cèl·lules,

també tenen una gran capacitat per establir tumors. S'ha descrit que la implantació d'una única cèl·lula mare cancerígena, és capaç de proliferar i establir un tumor i, en aquest fet, recau la perillositat d'utilitzar teràpies que no incideixen en aquelles cèl·lules capaces de crear recurrència tumoral (Quintana, Shackleton *et al.* 2008). A més a més, aquestes cèl·lules normalment es localitzen al front invasiu del tumor i en els vasos sanguinis i limfàtics que l'alimenten, indicant la seva associació amb el tumor (Borovski, De Sousa *et al.* 2011).

### 9.1.2. Biologia molecular del GBM

El fet que els gliomes astrocítics malignes estiguin associats a una prognosi dolenta és degut a diverses característiques que li confereixen la seva malignitat:

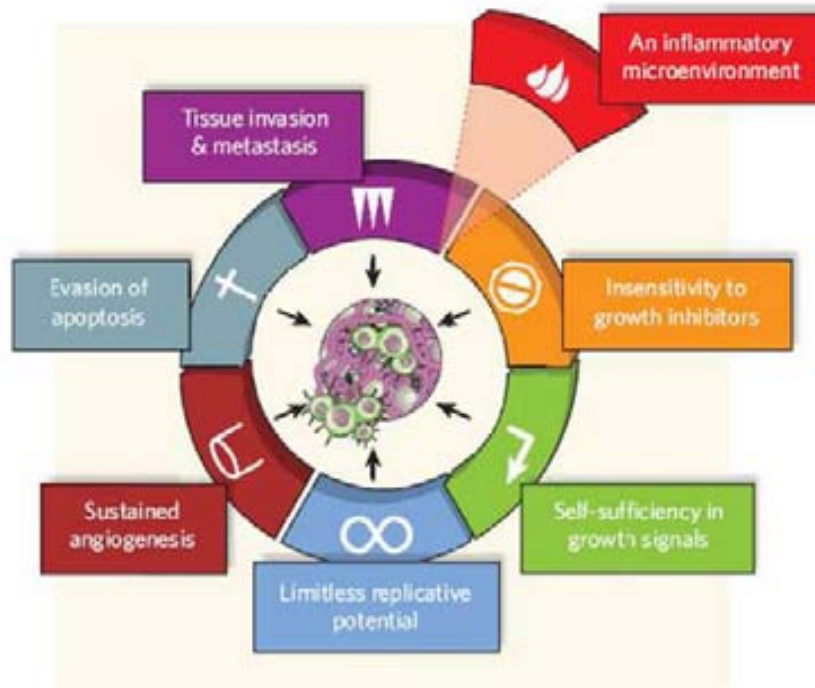
- Habilitat de les cèl·lules tumorals de proliferar il·limitadament (Igney and Krammer 2002).
- Habilitat d'infiltració i difusió del parènquima normal del cervell (Wolf and Friedl 2006).
  
- Alta capacitat d'invasió tissular i migració. Un dels primers passos en la invasió tumoral és la migració (Egeblad and Werb 2002). Les cèl·lules tumorals estan polaritzades i es mouen amb un mecanisme pel qual s'estenen per la seva banda frontal (en anglès, *cell front*) i, seguidament, es contrau la part posterior de la cèl·lula (en anglès, *cell rear*) i es produeix la locomoció (Wolf and Friedl 2006) (Figura I43).  
Habilitat per evadir l'apoptosi a través de mecanismes que ignoren els senyals de mort (com per exemple la unió del lligand de TRAIL i l'activació de les caspases) (Igney and Krammer 2002).
- Autosuficiència en senyals de creixement com EGF, PDGF, VEGF (Igney and Krammer 2002).
- 
-



**Figura 143.** Migració cel·lular a la part frontal de la cèl·lula (deguda a fibres d'actina) i retracció a la part de darrere de la cèl·lula (controlada per microtúbuls). A la part frontal, la polimerització d'actina induïda per cdc42/Rac, causa la formació de fil·lopodis i lamel·lipodis. Font (Lefranc, Brotchi et al. 2005).

- Angiogènesi sostinguda que permet l'accés de les cèl·lules de GBM als nutrients. (característica de les formes més malignes de càncer cerebral (Machein and Plate 2004, Jain, di Tomaso *et al.* 2007)).
- Microambient inflamatori privilegiat: recentment, les característiques distintives del càncer s'han revisat per incloure la inflamació i les interaccions de les cèl·lules tumorals amb el sistema immunitari de l'hoste com a part de la progressió de la malaltia (Mantovani 2009) (Figura 144). Al cervell, un òrgan ja de per si immunoprivilegiat, això és particularment important ja que les cèl·lules del sistema immune s'infiltra i ajuden al desenvolupament del procés maligne (Seo, Hayakawa *et al.* 2002).
- Altres característiques particulars com la hipòxia, propietats específiques de la matriu extracel·lular (per exemple la rigidesa) i interaccions amb cèl·lules estromals que contribueixen a la progressió del càncer (Pietras and Ostman 2010, Hanahan and Weinberg 2011).





**Figura 144. Els hallmarks del càncer.** Al 2000, Hanahan i Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000) van proposar un model que definia sis propietats que adquireixen els tumors: potencial replicatiu il·limitat, habilitat per desenvolupar vasos sanguinis (angiogenesis), evasió de la mort cel·lular programada (apoptosi), autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat als inhibidors de creixement i capacitat d'envair un teixit i generar metàstasi. Les troballes de Kim i col·laboradors (Kim, Takahashi *et al.* 2009), així com d'altres estudis (Coussens and Werb 2002, Mantovani, Allavena *et al.* 2008), van indicar que aquest model s'havia de revisar per incloure la inflamació relacionada amb el càncer com un altre *hallmark*. Font (Mantovani 2009).

### 9.1.3. Models d'estudi del GBM

La dificultat en seleccionar un model d'estudi del GBM, es troba en determinar el grau de mimetització del model amb la forma humana de GBM. Alguns dels models més utilitzats i les seves aplicacions es troben resumits a la Taula 15. El model més àmpliament utilitzat en GBM és la línia cel·lular U87MG, que deriva d'una pacient del 1966 (Beckman, Beckman *et al.* 1971). Aquesta línia cel·lular és molt utilitzada perquè el seu fenotip *in vitro* és molt invasiu, tot i que quan s'implanta en forma de xenoempelts en ratolins immunodeprimits, perd part d'aquesta capacitat invasiva.

**Taula 15. Models d'estudi de GBM.** Fonts (Bjerkvig, Tonnesen *et al.* 1990, Fillmore, Shurm *et al.* 1999, Dai and Holland 2001, Grobbs, De Deyn *et al.* 2002, Barth and Kaur 2009, de Vries, Beijnen *et al.* 2009, de Vries, Bruggeman *et al.* 2010).

Nom	Origen	Similaritats amb glioma humà	Utilitzats per testar:
<b>9L</b>	Rata, línia cel·lular carcinogènica induïda	Resposta immune, angiogènesi	Quimioteràpia, Radiació, vacunes
<b>C6</b>	Rata, línia cel·lular induïda viralment	Resposta immune, angiogènesi, invasió	Quimioteràpia, resecció, radiació, teràpia gènica, teràpia immune
<b>RT2</b>	Rata, línia cel·lular induïda viralment	Resposta immune, angiogènesi	Estructures d'Scherer's , Quimioteràpia , radiació, teràpia gènica
<b>GL26</b>	Ratolí, línia cel·lular induïda amb l'agent químic MCA (methylcholanthrene)	Resposta immune, angiogènesi	Quimioteràpia, radiació, teràpia immune, vacunes
<b>CNS1</b>	Ratolí, línia cel·lular induïda amb l'agent químic NMU (nitrosomethylurea)	Resposta immune, angiogènesi	Quimioteràpia, radiació, teràpia immune,
<b>U87MG</b>	Línia cel·lular derivada d'una pacient humana	Genoma, angiogènesi	Quimioteràpia, resecció radiació, teràpia immune, vacunes
<b>U251</b>	Línia cel·lular derivada d'un pacient humà	Genoma, angiogènesi	Angiogènesi
<b>Neuroesferes primàries</b>	Cèl·lules primàries d'un pacient humà	Invasivitat (formes estructures de Scherer), població cel·lular heterogènia, cèl·lules primàries, angiogènesi	Quimioteràpia, teràpia específica de cèl·lules mare
<b>Ratolí genèticament modificat</b>	Ratolí, mutació específica induïda	Invasió, desenvolupament i progressió de la malaltia, variabilitat en grups	Quimioteràpia, teràpia específica de proteïna

#### 9.1.4. Tractament actual (i raons per la seva baixa eficiència)

La primera línia de tractament des de fa anys inclou la resecció del tumor per cirurgia, seguit de tractaments amb radioteràpia i quimioteràpia amb temozolomida (Wallner, Galicich *et al.* 1989). La mida i localització del tumor són paràmetres importants a l'hora de possibilitar una cirurgia òptima (Bergenheim, Malmstrom *et al.* 2007). La resecció està limitada per l'experiència del cirurgià i per la disponibilitat de determinats equipaments com l'MRI (de l'anglès, *Magnetic*

*ressonance imaging*) per monitoritzar l'operació internament (Stummer, Reulen *et al.* 2008). S'estan desenvolupant noves tecnologies d'imatge intra-operació amb l'objectiu de poder marcar els límits del tumor per millorar l'eficiència de la resecció, però avui en dia, molts cirurjans es basen en gran part amb el tacte diferencial que té el teixit tumoral i en l'MRI per determinar els límits del tumor (Trehin, Figueiredo *et al.* 2006). Això comporta la impossibilitat d'extreure el tumor sencer degut a la invasió d'algunes cèl·lules tumorals en el cervell sa. De forma similar, degut a la invasió de les cèl·lules, la radioteràpia no arriba a moltes de les cèl·lules tumorals per evitar dany en el teixit sa. Amb la quimioteràpia passa el mateix, els agents quimioteràpics s'alliberen de forma sistèmica i entren al tumor via els vasos sanguinis i la seva efectivitat està limitada a la capacitat de poder travessar la barrera hematoencefàlica i de difondre's pel tumor (Jain 1999, Jain 2001). Això significa que, sovint, els agents quimioterapèutics no poden arribar a les cèl·lules que estan en un procés d'invasió del teixit sa.

Com s'ha esmentat anteriorment, la mitjana de supervivència dels pacients amb GBM des del moment de la diagnosi és d'uns tres mesos sense tractament. Amb cirurgia seguida de radioteràpia postoperatoria, la supervivència incrementa a aproximadament un any (mitja de 12,1 mesos). Si a més, en el període postoperatori es combina la radioteràpia amb quimioteràpia (temozolomida), la mitjana de supervivència incrementa a 14,6 mesos (Stupp and Weber 2005). En el seguiment posterior d'aquest estudi, es va concloure que només un 10% dels pacients sobrevivia fins a cinc anys amb el tractament combinat de radioteràpia i temozolomida comparat amb menys d'un 2 % si el pacient era tractat només amb radioteràpia (Mirimanoff 2008). Així doncs, el tractament actual no és suficient i és necessari desenvolupar noves teràpies. Per fer-ho, és important entendre perquè aquestes metodologies fallen i, això és degut en bona part, a les característiques invasives del GBM i a que els fàrmacs no són capaços de travessar la barrera hematoencefàlica. Un altre problema afegit són les alteracions que tots els mètodes terapèutics indueixen en els tumors i que n'augmenten la seva malignitat o capacitat invasiva. S'han descrit casos, on la resecció ha causat un augment en la malignitat del tumor degut a la proliferació de les cèl·lules mare del glioma (Kim and Tannock 2005). Així mateix, la quimioteràpia també pot causar alteracions en el grau de malignitat de les

cèl·lules cancerígenes (Dinnes, Cave *et al.* 2002), i la radiació i les teràpies angiogèniques poden fer augmentar la capacitat invasiva del tumor (Wild-Bode, Weller *et al.* 2001, Kamba and McDonald 2007).

### **9.1.5. Altres estratègies terapèutiques: TRAIL com a teràpia prometedora en el GBM**

En l'apartat anterior, es fa evident que cal continuar la recerca de tractaments més efectius per poder fer front al GBM. En l'actualitat, s'estan investigant molts àmbits diferents en els quals s'estan produint millores. Donat el gran ventall d'estratègies terapèutiques que s'estan investigant, i el fet que han estat àmpliament revisades (Lefranc, Brotchi *et al.* 2005, Huang, Sarkaria *et al.* 2009, Clarke, Butowski *et al.* 2010), em centraré en l'activació dels receptors de TRAIL com a teràpia prometedora en GBM.

#### ➤ **Expressió de TRAIL i TRAILR en teixits humans normals**

Els coneixements en referència a l'expressió de TRAIL en teixits humans normals és limitada. S'ha pogut detectar a fetge, conductes biliars, ronyó, cardiomiòcits, epiteli pulmonar, cèl·lules de Leydig, epiteli odontogènic normal, cèl·lules megacariocítiques i cèl·lules eritroides (Secchiero, Melloni *et al.* 2004, Spierings, de Vries *et al.* 2004, Kumamoto and Ooya 2005, Melloni, Secchiero *et al.* 2005). Per contra, no s'ha pogut detectar en colon, glomèruls, nansa de Henle, cèl·lules germinals i de Sertoli dels testícles, endoteli de diversos òrgans, cèl·lules de múscul llis pulmonar, melsa i cèl·lules fol·liculars de la glàndula tiroide (Strater, Hinz *et al.* 2002, Daniels, Turley *et al.* 2005). L'expressió en cervell no està definida encara ja que alguns estudis demostren l'expressió en cèl·lules glials del cerebel (Frank, Kohler *et al.* 1999, Daniels, Turley *et al.* 2005), però d'altres, no ho han pogut confirmar (Dorr, Bechmann *et al.* 2002). En acordança amb TRAIL, els seus "receptors de mort" (TRAIL-R1/R2) s'expressen en molts teixits normals (Dorr, Bechmann *et al.* 2002, Arts, de Jong *et al.* 2004, Spierings, de Vries *et al.* 2004). L'endoteli vascular del cervell sembla ser negatiu per TRAIL-R1 i dèbilment positiu per TRAIL-R2 (Spierings, de Vries *et al.* 2004). En quant als decoy receptors, TRAIL-R3/R4 s'han detectat en oligodendròcits de neurones (Dorr, Bechmann *et al.* 2002).

➤ **Expressió dels receptors de TRAIL en glioblastoma**

TRAIL-R1/R2, s'expressen de forma ubíqua en diversos tipus tumorals (Strater, Hinz *et al.* 2002, Arts, de Jong *et al.* 2004, Spierings, de Vries *et al.* 2004, Stander and Schwarz 2005, McCarthy, DiVito *et al.* 2006, van Geelen, Westra *et al.* 2006). També s'expressen en el teixit tumoral d'astrocitomes de grau II i glioblastomes, i sembla que els tumors més malignes expressen més quantitat de receptors de TRAIL en comparació amb tumors menys malignes o teixits normals (Frank, Kohler *et al.* 1999). En general, TRAIL-R2 s'expressa més freqüentment en cèl·lules tumorals que TRAIL-R1 (Frank, Kohler *et al.* 1999). Diversos estudis en línies cel·lulars de GBM no han pogut correlacionar la sensibilitat a TRAIL amb els nivells d'expressió de TRAIL-R1/R2, ni tampoc amb l'expressió dels decoy receptors TRAIL-R3/R4 (Knight, Riffkin *et al.* 2001, Hetschko, Voss *et al.* 2008).

➤ **Teràpia tumoral: TRAIL recombinant i anticossos específics per TRAIL-Rs.**

Tant el lligand TRAIL com els anticossos agonistes dirigits als "receptors de mort" TRAIL-R1 i / o TRAIL-R2, són fàrmacs potencialment anticancerígens (Marini 2006, Ashkenazi, Holland *et al.* 2008, Hotte, Hirte *et al.* 2008). Així, molts tipus tumorals són sensibles a la mort apoptòtica induïda per TRAIL, mentre que les cèl·lules humanes normals en són resistents i, això, és un dels motius pels quals és una estratègia prometedora. Diverses preparacions de TRAIL han demostrat tenir efectes tumoricides *in vitro* i *in vivo*. Per exemple, l'aplicació localitzada de TRAIL en un model de xenoempelt intracraneal de la línia cel·lular U87MG de GBM, va augmentar la vida mitja dels ratolins de 36 dies (no tractats) fins a 100 dies (animals tractats) (Marini 2006, Ashkenazi, Holland *et al.* 2008, Hotte, Hirte *et al.* 2008). A més a més, en pacients de B-CLL (de l'anglès, *B-cell chronic lymphocytic leukemia*), s'està explorant una forma recombinant trimèrica de TRAIL que no presenta efectes secundaris significatius als pacients (Marini 2006, Ashkenazi 2008, Ashkenazi, Holland *et al.* 2008, Hotte, Hirte *et al.* 2008). Aquests estudis corroboren que TRAIL és una eina segura per al tractament anticancerígen en humans.

D'altra banda, s'han desenvolupat un bon nombre d'anticossos agonistes (HGSETR1, HGS-ETR2, HGS-TR2J, LBY135, CS-1008, AMG 655) que reconeixen TRAIL-R1 o bé TRAIL-R2 de forma selectiva. Tots ells tenen una activitat tumoricida potent *in vitro* i *in vivo* i en alguns estudis clínics han conclòs que tenen poca toxicitat (Duiker, Mom *et al.* 2006, Tolcher, Mita *et al.* 2007, Greco, Bonomi *et al.* 2008, Hotte, Hirte *et al.* 2008).

### ➤ **Resistència dels GBMs a TRAIL**

Els resultats obtinguts fins al moment en tests clínics, fan pensar que l'ús de TRAIL pot ser una bona teràpia, però la resistència intrínseca o adquirida que te el GBM a l'estímul de TRAIL en complica la seva eficàcia. Aquesta resistència pot ser deguda a diversos factors: l'expressió de gran quantitat de *decoy receptors* (Knight, Riffkin *et al.* 2001); la baixa expressió de molècules de la via de senyalització de TRAIL, com caspasa-8 i FADD (Knight, Riffkin *et al.* 2001); o l'elevada expressió d'inhibidors de l'apoptosi, com cFLIP (Irmeler, Thome *et al.* 1997, Condorelli, Vigliotta *et al.* 1999, Wang, Lobito *et al.* 2000). A més, la resistència a TRAIL observada en els models cel·lulars sembla empitjorar en GBMs primaris extrets de pacients. Aquests fets, fan veure que el benefici de TRAIL com a teràpia ha d'anar encaminat combinar-lo amb d'altres agents anti-cancerígens i no utilitzar-lo aïlladament. Avui en dia, es coneix que la resistència intrínseca o adquirida a TRAIL sovint pot ser superada amb una combinació d'agents basats en TRAIL i quimioteràpics, radiació o altres agents terapèutics nous.

### ➤ **Teràpia combinada de TRAIL i radio-/quimioteràpia**

Tant la radioteràpia com la quimioteràpia, han estat estudiades en combinació amb TRAIL en estudis preclínics en diversos tipus de tumors i, en GBM, s'han obtingut resultats positius en quant a regressió tumoral després de teràpies combinatòries (Chinnaiyan, Prasad *et al.* 2000, Gong and Almasan 2000, Nagane, Pan *et al.* 2000, Zhou, Fukushima *et al.* 2000, Di Pietro, Secchiero *et al.* 2001, Kim, Lee *et al.* 2001, Rohn, Wagenknecht *et al.* 2001, Ramp, Caliskan *et al.* 2003, Song, Song *et al.* 2003, Saito, Bringas *et al.* 2004, Ciusani, Croci *et al.* 2005, Nagane, Cavenee *et al.* 2007). Per exemple, l'administració sistèmica *in vivo* de TRAIL amb cisplatí, suprimeix sinèrgicament

la formació i el creixement de xenoempelts de GBM humà establerts de forma subcutània en ratolins immunodeprimits i incrementa de forma significativa la seva supervivència comparat amb ratolins només tractats amb un sol agent quimioterapèutic (Nagane, Pan *et al.* 2000). En un altre estudi, l'eficàcia de la infusió de TRAIL intracerebral es va veure incrementada pel cotractament amb temozolomida en un model de xenoempelt intracraneal de U87MG (Saito, Bringas *et al.* 2004).

➤ **Teràpia combinada de TRAIL amb nous agents quimioterapèutics**

Estudis preclínic han evaluat la combinació de TRAIL amb una gran varietat de noves aproximacions terapèutiques amb l'objectiu de potenciar el seu efecte sinèrgic pro-apoptòtic. Els resultats de tots aquests estudis, demostren clarament el benefici afegit de la combinació de teràpies a l'hora d'estimular la citotoxicitat mediada per TRAIL. A continuació s'exposaran alguns exemples:

- **TRAIL/Bortezomib.** El bortezomib inhibeix la via proteasoma-ubiquitina que controla la degradació de la majoria de proteïnes cel·lulars (Mani and Gelmann 2005). És important destacar el seu efecte diferencial en cèl·lules normals o cancerígenes. Ambdues aturen el seu cicle cel·lular a la fase G2/M en resposta a bortezomib, però mentre que les cèl·lules tumorals moren per apoptosi, les normals reestableixen la divisió cel·lular després del tractament (Mani and Gelmann 2005). S'ha demostrat el seu efecte sinèrgic amb d'altres terapèutics inclòs TRAIL (Brooks, Ramirez *et al.* 2005), i s'ha demostrat que els GBMs resistents a TRAIL són especialment sensibles a la combinació TRAIL / Bortezomib (Koschny, Holland *et al.* 2007).
- **TRAIL/Rapamicina.** La Rapamicina és un antibiòtic que inhibeix mTOR (de l'anglès, *mamalian target of Rapamycin*) i, així, inhibeix la via de supervivència Akt-mTOR que sovint es troba *upregulada* en GBM. Cal destacar que la rapamicina sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi mediada per TRAIL. La via d'Akt-mTOR està relacionada amb l'estat del gen supressor de tumors PTEN (de l'anglès, *phosphatase and tensin homolog*) en GBMs, i aquesta informació es podria utilitzar per identificar els pacients que es podrien beneficiar de la teràpia TRAIL/Rapamicina (Panner, Parsa *et al.* 2006).

- **TRAIL/Antagonistes de XIAP.** S'estan portant a terme estudis clínics on utilitzen oligonucleòtids antisentit contra el mRNA de XIAP (Tamm 2008).
- **TRAIL/microRNAs (miRs).** Els miRs són ARNs no codificants petits (20-22 nucleòtids), que degraden o inhibeixen la traducció de l'ARN missatger unint-se a seqüències de reconeixement dins la seqüència de ARN missatger. Un sol miR pot modular un gran nombre de gens i la seva funció (Ren, Zhou *et al.* 2010, Zhou, Ren *et al.* 2010). En l'apoptosi, per exemple, diversos miRs afavoreixen un fenotip de resistència a l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Ren, Zhou *et al.* 2010, Buscaglia and Li 2011). S'ha descrit que diversos miRs poden modular la senyalització de TRAIL i altres membres de la família de TNF (Quintavalle, Donnarumma *et al.* 2012). En GBM, específicament el miR21, es troba sobre expressat en >90% dels tumors analitzats (Gabriely, Wurdinger *et al.* 2008, Zhou, Ren *et al.* 2010). La seva inhibició inhibeix de forma significativa el creixement del GBM i, el co-tractament amb antimir21 en cèl·lules mare neurals que expressen TRAIL, provoca una inhibició sinèrgica del creixement del tumor *in vivo* (Corsten, Miranda *et al.* 2007).
- **TRAIL/proteïnes anti-apoptòtiques de la família de Bcl-2.** En GBMs, les proteïnes de la família de Bcl-2 es troben sobre expressades de manera freqüent, promovent la supervivència cel·lular. Com s'explica a l'apartat "Les proteïnes de la família de Bcl-2 com a dianes terapèutiques per al tractament de càncer", s'està investigant la inhibició selectiva d'aquestes proteïnes amb l'ús dels BH3-mimetics. Concretament en GBM, l'ús d'ABT-737 (Oltersdorf, Elmore *et al.* 2005), ha demostrat augmentar la supervivència de ratolins amb un xenoempelt intracraneal de GBM (Tagscherer, Fassel *et al.* 2008). A més, ABT-737 augmenta sinèrgicament l'activitat de TRAIL en cèl·lules de GBM.

En totes aquestes estratègies combinatòries, cal fer una consideració important, i són els possibles efectes que aquestes teràpies puguin causar en cèl·lules sanes. Per exemple, la combinació de TRAIL/Bortezomib promou la mort de les cèl·lules tumorals d'hepatoma (Koschny, Ganten *et al.* 2007), però també augmenta la toxicitat en hepatòcits i, a més, fa que aquests esdevinguin més sensibles a Fas (Corazza, Jakob *et al.* 2006). És per això que cal continuar investigant en les teràpies combinatòries de TRAIL amb altres agents que no siguin citotòxiques.







*II.*

Antecedents i objectius



Resultats previs del laboratori publicats amb anterioritat (Gozzelino, Sole *et al.* 2008), van demostrar que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> era un factor determinant per a poder sensibilitzar cèl·lules PC12 i neurones corticals d'embrió de ratolí a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$ . Aquest estudi plantejava tres qüestions principals que vam decidir abordar:

- En primer lloc, les cèl·lules PC12 no expressen Bcl-2 (Vaux, Cory *et al.* 1988, Gozzelino, Sole *et al.* 2008). Això comportava que, en aquest model, no era possible definir si la sensibilització a la mort induïda per TNF $\alpha$  era deguda exclusivament al silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> o també es veia afavorida per l'absència de Bcl-2.
- En segon lloc, tot i que s'ha reportat que Bcl-x<sub>L</sub> és diana de NF- $\kappa$ B (Fennell, Chacko *et al.* 2008), quan l'activitat NF- $\kappa$ B estava inhibida per la sobre-expressió d'un mutant d'I $\kappa$ B no degradable el qual actua reprimint a NF- $\kappa$ B (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ ), les cèl·lules PC12 esdevenien sensibles a l'estímul de mort de TNF $\alpha$  sense alterar els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>. Això, suggeria que Bcl-x<sub>L</sub> podria no ser una diana de la via de NF- $\kappa$ B, al menys en aquestes cèl·lules i que, per tant, Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B podrien estar involucrats en vies independents de supervivència. De totes maneres, aquests fets encara no es coneixen amb certesa i seria interessant aprofundir en l'estudi per poder determinar si Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B formen part d'una mateixa via.
- En tercer lloc, els resultats van apuntar clarament a Bcl-x<sub>L</sub> com a una molècula essencial per al control de la decisió sobre si una cèl·lula ha de morir o no en front a l'estímul de TNF $\alpha$ . L'estudi, però, es va centrar en Bcl-x<sub>L</sub> i no aprofundia en establir si altres membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 podrien exercir funcions similars, ni en el mecanisme pel qual Bcl-x<sub>L</sub> era capaç de regular la resposta de les cèl·lules a la mort induïda per TNF $\alpha$ .

Amb l'objectiu d'abordar aquestes tres qüestions, vam plantejar-nos l'**objectiu general** de caracteritzar els mecanismes que controlen l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  en un context on NF- $\kappa$ B estava inhibit.

Els **objectius específics** consistien en:

1. Estendre els resultats esmentats a un model cel·lular àmpliament acceptat com són les cèl·lules HeLa ja que, a més, es coneix que expressen Bcl-2.
2. Caracteritzar si el silenciament dels altres membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 podia sensibilitzar a la mort induïda per TNF $\alpha$  de la mateixa manera que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>.
3. Determinar si les vies de supervivència controlades per Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B són independents o no.
4. Caracteritzar si el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> era un mecanisme general per sensibilitzar diferents tipus cel·lulars a la mort induïda per TNF $\alpha$ .

L'anàlisi dels punts anteriors, ens va permetre observar que determinades línies cel·lulars eren resistents a la mort induïda per TNF $\alpha$  fins i tot quan Bcl-x<sub>L</sub> estva silenciada. Ens vam interessar en l'estudi de la resistència en diverses línies de Glioblastoma, i així, ens vam plantejar un **segon objectiu general**: estudiar els mecanismes de resistència a la mort induïda per via extrínseca en línies derivades de Glioblastoma humà.

En aquest cas, els **objectius específics** van ser:

1. Analitzar si el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> o d'algun dels altres membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1), podria sensibilitzar a línies derivades de Glioblastoma humà a la mort induïda per via extrínseca a través d'algun dels tres "receptors de mort" TNF $\alpha$ , FasL i TRAIL.
2. En cas afirmatiu, estudiar els mecanismes moleculars pels quals les cèl·lules són sensibilitzades a la mort cel·lular.







*III.*

Materials i mètodes



## 1. Reactius

El TNF $\alpha$  humà recombinant (CYT-223) i el TRAIL humà recombinant (CYT-443) van ser obtinguts de AbBcn S. L. (Barcelona, Espanya). L'anticòs agonista de Fas, CH11 (05-201), va ser obtingut de Millipore (MA, EUA). L'inhibidor de caspases d'ampli espectre q-VD-OPh de MPBiomedicals Europe (Illkirch, França). L'inhibidor de la necroptosi, Necrostatin-1, de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). El substrat fluorogènic de caspases Ac-DEVD-afc de Calbiochem (San Diego, CA). L'inhibidor de la síntesi macromolecular, Actinomycin-D (A9415), de Sigma. Els *BH3-mimetics* de la família de Bcl-2, ABT-737 (S1002), Gossypol (S2303), GX15 / Obatoclastax (S1057) i TW-37 (S1121), van obtenir-se de Selleck Chemicals (TX, EUA). Els anticossos anti-I $\kappa$ B (C-21) (sc-371), anti-clAP2 (sc-7944) i anti-RelA/p65 (subunitat de NF- $\kappa$ B) (sc-372) es van obtenir de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anti-Bcl-2 (M0877) de DAKO (Glostrup, Denmark). L'anti-Bcl-w (AM54) de Calbiochem (La Jolla, Calif.). Els anticossos contra citocrom C (556433), pro-caspasa-8 (551242), Bcl-x<sub>L</sub> (610211), i panERK (612641) es van comprar a BD Biosciences (San Diego, CA). L'anticòs anti-pro-caspasa-3 (9662) i el l'anti-pro-caspasa-7 (9492) de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). L'anticòs anti-pro-caspasa-6 (M070-3) i l'anti-pro-caspasa-9 (clon 5B4) (M-054-3) de MBL (Naka-ku Nagoya, Japó). L'anti-fodrina (AA6) (MAB1622) de Millipore. L'anti-p23 (JJ3) (NB300-576) era de Novus Biologicals (Cambridge, UK). L'anti-Mcl-1 (M8434) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). L'anti-Smac / DIABLO (2409) de ProSci Inc (CA, EUA). Si no s'indica el contrari, la resta de reactius van ser obtinguts de Sigma-Aldrich.

## 2. Cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars HeLa (adenocarcinoma de cervix humà), A549 (adenocarcinoma alveolar humà), HC116 (carcinoma colorectal humà), MIA PaCa-2 (adenocarcinoma pancreàtic humà), Panc-1 (carcinoma pancreàtic humà), PC3 (adenocarcinoma de pròstata humà), RD (Rhabdomiosarcoma embrionari humà) i totes les línies de Glioblastoma U87MG, A172, LN18, LN229, T98G, U251MG i U373MG van ser cultivades en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, 41965-062, Invitrogen). Aquest medi conté una alta

concentració de glucosa (25 mM), L-glutamina (3,97 mM) i vermell de fenol (0,0399 mM). Les línies cel·lulars DU-145 (carcinoma de pròstata humà) i HepG2 (carcinoma hepatocel·lular humà) van ser cultivades en *Minimum Essential Medium* (MEM, 31095-052, Invitrogen). Aquest medi conté L-glutamina (2 mM) i phenol red (0,0266 mM). Per tots els tipus cel·lulars, el medi de cultiu va ser complementat amb un 10 % de sèrum fetal boví, 20 unitats/mL de penicil·lina i 20 µg/ml d'estreptomicina (Invitrogen). Les cèl·lules van ser cultivades a 37°C en una atmosfera saturada d'humitat, amb un 95 % d'oxigen i un 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 3. Constructes plasmídics i transfecció de plàsmids

El vector reporter per a NF-κB (HIV-LTR-Luciferase) i el cDNA del súper-repressor de IκBα (SR-IκBα) (Rodriguez, Wright *et al.* 1996) van ser obtinguts de R. Hay (Universitat de St. Andrews, Fife, Escòcia). El cDNA del SR-IκBα es va subclonar en el vector d'expressió eucariota pcDNA3. Per les sobre-expressions transitòries, el vector que conté el SR-IκBα (pcDNA3-SR-IκBα), Bcl-x<sub>L</sub> humà (pcDNA3-Bcl-x<sub>L</sub>) o el vector buit pcDNA3 (Neo) (Yuste, Sanchez-Lopez *et al.* 2002, Sole, Dolcet *et al.* 2004) van ser transfectats en les cèl·lules HeLa utilitzant la *Lipofectamine 2000 Reagent* (11668-019, Invitrogen). 24 h abans de la transfecció, les cèl·lules van ser sembrades en plaques P35 a una confluència de 150.000 cèl·lules/mL en medi DMEM amb sèrum fetal boví i antibiòtics. L'endemà, es va aspirar el medi, es va fer un rentat de les cèl·lules amb PBS 1X i es van afegir 2 mL de medi DMEM amb sèrum fetal boví però sense antibiòtics. Seguidament, el procés de transfecció es va realitzar utilitzant 1/3 d'ADN i 1/4 de *Lipofectamine 2000 Reagent* de les quantitats recomanades pel fabricant. Així, per cada condició es van preparar dues mescleres. La primera contenia 1,3 µg d'ADN en 184 µL de DMEM (sense sèrum fetal boví ni antibiòtics) i, la segona, 2,5 µL de *Lipofectamine 2000 Reagent* amb 60 µL de DMEM (sense sèrum fetal boví ni antibiòtics). Després d'incubar cadascuna d'elles a temperatura ambient durant 5 min, es van mesclar, es van incubar 20 min més a temperatura ambient i es van afegir, gota a gota, en el medi de les plaques que contenien els cultius cel·lulars. 4 h després de la transfecció, es va aspirar el medi de cada placa i es va substituir per DMEM amb sèrum fetal boví i antibiòtics. 24 h posteriors a la

transfecció, les cèl·lules es van recollir, es van rentar amb PBS 1X i es van sembrar de nou en les plaques adients per a realitzar els tractaments corresponents. A més a més, les cèl·lules transfectades amb els vectors pcDNA3-SR-I $\kappa$ B o pcDNA3 (Neo) van ser seleccionades durant un mes en presència d'1mg/mL de G-418 (Invitrogen) i es van utilitzar un cop van expressar els vectors de forma estable. L'eficiència de les sobe-expressions del SR-I $\kappa$ B $\alpha$  i/o de Bcl-x<sub>L</sub> van ser analitzades per *Western blot*.

### 3.1. Preparació de bacteries quimio-competents

Per tal de poder transformar les bacteries *E. Coli DH5  $\alpha$* , cal que aquestes adquireixin l'habilitat de poder introduir el DNA. Els procediments per preparar bacteries competents es fan en ambient estèril (bunsen) i mantenint sempre les bacteries en gel per evitar que perdin viabilitat.

Es va créixer prèviament un pre-inòcul de 3 mL, típicament es parteix d'una alíquota de 5  $\mu$ L de bacteries anteriorment preparades o d'un stock de la soca guardat a -80°C, i es va deixar créixer durant 16h a l'agitador orbital a 37°C. El dia següent, es van inocular 200 mL de LB a partir d'aquests 3 mL i es van incubar a 37°C en agitació a l'incubador orbital fins que el cultiu va arribar a una OD<sub>600</sub> de 0,5. Aleshores es va deixar refredar en gel durant 5min, es va passar el cultiu a Falcons de 50 mL i es van centrifugar 5 min a 4000g i 4°C. Els sobrenedants es van decantar i els sediments es van ressuspendre en 30 mL de TFB1 (100mM clorur de rubidi (Fluka), 50 mM clorur de magnesi (Sigma), 230 mM acetat potàssic (Panreac), 10mM clorur de calci (Panreac), 15% (v/v) glicerol (Fluka); pH=5,8 (HCl)) per cada 100 mL de cultiu centrifugat. Es va incubar en gel durant 90 min. Es van centrifugar 5 min a 4000g a 4°C i es va decantar el sobrenedant, mantenint sempre les bacteries en gel. Els sediments es van ressuspendre en TFB2 (10mM MOPS (Fluka), 10 mM clorur de rubidi, 75 mM clorur de calci, 15% (v/v) glicerol; pH=6,8 (HCl)). Els dos tampons s'esterilitzen per filtració mitjançant filtres de 0,22  $\mu$ m (Millex)), en una proporció de 4 mL per cada 100 mL de cultiu originals, i es van fer alíquotes de 100  $\mu$ l en tubs eppendorfs freds (-80°C), mantenint-los en neu carbònica, i es van

emmagatzemar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Típicament l'eficiència és del rang 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> colònies/ $\mu\text{g}$  DNA transformat.

### **3.2. Mètode d'amplificació plasmídica: Transformació de DNA en *E. Coli***

Les cèl·lules *E. Coli DH5  $\alpha$*  competents (fabricades al laboratori com s'indica a l'apartat anterior) es van descongelar durant 10 minuts en gel. 10 ng de plàsmid i 50  $\mu\text{l}$  d'*E. Coli DH5  $\alpha$*  competents es van incubar en un tub estèril 30 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ , es van sotmetre en a un xoc tèrmic incubant la mestra a  $42^{\circ}\text{C}$  durant 1 minut i, després de deixar-ho en gel 2 minuts més, es van afegir 950  $\mu\text{l}$  de medi de cultiu LB (Luria Broth) (Sigma) i es van incubar durant 1 h i 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm (revolucions per minut). Posteriorment, 100  $\mu\text{l}$  d'aquestes bactèries transformades es van sembrar en plaques d'LB amb 20 g/L d'agar amb ampicil·lina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que va permetre seleccionar les bactèries que contenen el plàsmid.

### **3.3. Extracció de plàsmids mitjançant “minipreps” o “maxipreps”**

De les colònies *E.coli DH5 $\alpha$*  transformades amb el plàsmid corresponent i crescudes en les plaques d'LB agar, se'n va seleccionar una que va ser inoculada en 3 mL (minicultiu) de medi de cultiu LB amb ampicil·lina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i es va deixar créixer a  $37^{\circ}\text{C}$  durant tota la nit a 200 rpm. Per tal d'obtenir “minipreps” d'ADN plasmídic, es va utilitzar 1,5 mL dels minicultius i es van purificar amb el kit *NucleoSpin Plasmid* seguint les instruccions del fabricant. En el cas de les “maxipreps” d'ADN plasmídic, 300  $\mu\text{l}$  provinents dels 3 mL de minicultiu es van incubar novament en 300 mL de LB amb ampicil·lina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i es van incubar tota la nit en les mateixes condicions. La purificació dels plàsmids amplificats es va realitzar amb el kit *Nucleobond maxi kit* seguint les instruccions del fabricant. Finalment, l'ADN plasmídic es va dissoldre en 30  $\mu\text{l}$  en el cas de les “minipreps” o en els  $\mu\text{l}$  necessaris fins a obtenir una concentració de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en el cas de les “maxipreps”. La concentració dels àcids nucleics es va determinar mitjançant un espectrofotòmetre de llum UV-visible (NanoDrop).

## **4. Transfecció de siRNAs**

La transfecció dels siRNAs es va dur a terme amb el reactiu *DharmaFECT-1* (Dharmacon). Els siRNAs es van transfectar a una concentració

final de 35 nM. El procediment va ser el següent: 24 h abans de la transfecció es van sembrar les cèl·lules en plaques P35 a una confluència de 150.000 cèl·lules/mL en medi DMEM complet. L'endemà, es va aspirar el medi, es va fer un rentat de les cèl·lules amb PBS 1X i es van afegir 1,6 mL de medi DMEM sense sèrum fetal boví ni antibiòtics en cada placa. Seguidament, per cada condició es van preparar dues mescles. La primera contenia 1,5 µL de siRNA (50 µM) amb 98,5 µL de DMEM (sense sèrum fetal boví ni antibiòtics) i, la segona, 1,5 µL de *DharmaFECT-1* amb 198,5 µL de DMEM (sense sèrum fetal boví ni antibiòtics). Després d'incubar cadascuna d'elles a temperatura ambient durant 5 min, es van mesclar, es van incubar 20 min més a temperatura ambient i es van afegir gota a gota en el medi de les plaques que contenien els cultius cel·lulars. 5 h després de la transfecció, es va afegir a cada placa 216 µL de sèrum fetal boví per tal que la concentració final a cada placa fos del 10 %. 3 dies posteriors a la transfecció, les cèl·lules es van recollir, es van rentar amb PBS 1X i es van sembrar de nou en DMEM complet i fresc en les plaques adjacents per a realitzar els tractaments corresponents.

Per caspasa-8, es va utilitzar una mescla de dos siRNAs. Les seqüències dels siRNAs van ser:

siRNAs	Seqüència
<b>Bcl-2</b>	5'-GGAUCAUGCUGUACUUAAA-3'
<b>Bcl-w</b>	5'-UGAGGAAGGUGGACUUACA-3'
<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>	5'-CAGGCGACGAGUUUGAACU-3'
<b>Caspasa-8</b>	5'-GAAUGUUGGAGGAAAGCA-3' 5'-ACAUGAACCUGCUGGAUUAU-3'
<b>Mcl-1</b>	5'-GGUUUGGCAUAUCUAAUAA-3'
<b>Sense sentit</b>	5'- AUAUGCGAUCGAGAUUAUCG-3'
<b>Smac / DIABLO</b>	5'- CCGACAAUAUACAAGUUU -3'
<b>XIAP</b>	5'-GGAUAUACUCAGUUAACAA-3'

## 5. Preparació d'extractes citosòlics

Els extractes citosòlics es van obtenir amb el procediment següent: les cèl·lules van ser recollides i centrifugades a 200 x g durant 5 minuts, es van

resuspendre en PBS (de l'anglès, *phosphate buffered saline*) fred (pH 7.2), es van tornar a centrifugar 5 minuts més a 200 x g i es van resuspendre en 5 volums de tampó d'extracció citosòlica (70 mM Sucrose, 220 mM Mannitol, 5 mM HEPES-KOH pH 7.2, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.025% Digitonine, 1 mM PMSF, 1 mM DTT), es van agitar al vòrtex durant 5 segons i es van incubar durant 5 minuts a 4°C. Els llisats es van centrifugar durant 5 minuts a 600 x g en una microcentrífuga prèviament refredada a 4°C i els sobrenedants van ser recollits en tubs nous i quantificats mitjançant el mètode de Lowry modificat (Bio-Rad Dc protein assay).

## **6. Extracció de proteïnes totals i Western blot**

Després de sotmetre les cèl·lules a les diferents condicions de tractament, les cèl·lules va ser resuspeses en PBS fred (pH 7.2). Les cèl·lules es van llisar en un tampó de llisi que contenia un 2 % d' SDS i 125 mM Tris (pH 6.8), es van escalfar a 95 °C durant 10 minuts i la concentració de proteïnes es va quantificar utilitzant el mètode de Lowry modificat (Bio-Rad Dc protein assay). Els llisats cel·lulars (25 µg de proteïna) es van separar per tamany en gels SDS/PAGE a una densitat d'entre 10 i 15 %, depenent del pes molecular de la proteïna a detectar, aplicant una velocitat electroforètica de 25 mA/gel durant 1h 15 minuts aproximadament. Després, els gels es van transferir a una membrana de transferència Immobilon-P<sup>™</sup> PVDF (Millipore). Després de bloquejar les membranes amb un tampó de Tris salí / 0.1% Tween-20 que contenia un 5% de llet sense grasses ni additius durant 1 h a temperatura ambient, les membranes van ser incubades amb els anticossos primaris corresponents en cada cas d'acord amb els requeriments específics indicats per cada proveïdor. Després d'una hora d'incubació amb els anticossos secundaris pertinents conjugats amb peroxidasa durant 1 h, les membranes es van revelar utilitzant el kit de detecció per quimioluminiscència EZ-ECL (Biological Industries).



Els anticossos utilitzats en aquesta tesi es descriuen en la següent taula.

Anticòs	Pes molecular (proforma i / o fragment)	Font	Dilució	Casa comercial	Nº Catàleg
$\alpha$ -Bcl-2	26 kDa	Mouse	1 : 1.000	DAKO	M0877
$\alpha$ -Bcl-X <sub>L</sub>	29 kDa	Rabbit	1 : 3.000	BD Transduction Laboratories	610211
$\alpha$ -Bcl-w	21 kDa	Rat	1 : 1.000	Calbiochem	AM54
$\alpha$ -Caspasa-3	35 kDa, 17 kDa i 19 kDa	Rabbit	1 : 2.000	Cell Signaling	9662
$\alpha$ -Caspasa-6	34 kDa i 20 kDa	Mouse	1 : 2000	MBL	M070-3
$\alpha$ -Caspasa-7	35 kDa i 20 kDa	Rabbit	1 : 2.000	Cell Signaling	9492
$\alpha$ -Caspasa- 8	50 kDa	Mouse	1 : 1000	BD Biosciences	551242
$\alpha$ -Caspasa-9	51-37 kDa	Mouse	1 : 1.000	Cell Signaling	#9508
$\alpha$ -Cytochrome c	15 kDa	Mouse	1 : 1.000	BD Pharmingen	556433
$\alpha$ -pan-ERK1/2	42 kDa i 44kDa	Mouse	1 : 5.000	BD Transduction Laboratories	612641
$\alpha$ -Fodrin (AA6)	240 kDa, 180 kDa, 150 kDa i 120 kDa	Mouse	1 : 40.000	Millipore	MAB1622
$\alpha$ -cIAP 2	65 kDa	Rabbit	1 : 300	Santa Cruz	sc-7944
$\alpha$ -I $\kappa$ -B $\alpha$ (C-21)	37 kDa	Rabbit	1 : 1.000	Santa Cruz	sc-371
$\alpha$ -Mcl-1	40-42 kDa	Rabbit	1 : 10.000	Sigma	M8434
$\alpha$ -NF- $\kappa$ B p65 (C-20)	65 kDa	Rabbit	1 : 1.000	Santa Cruz	sc-372
$\alpha$ -p23 (JJ3)	23 kDa i 17 kDa	Mouse	1 :10.000	Novus Biological, Inc	NB300-576
$\alpha$ -SMAC/DIABLO	25 kDa	Rabbit	1 : 1.000	ProSci	2409
$\alpha$ -Mouse IgG	_____	Rabbit	1 : 10.000	Sigma	A9044
$\alpha$ -Rabbit IgG	_____	Goat	1 : 20.000	Sigma	A0545
$\alpha$ -Rat IgG	_____	Donkey	1 : 20.000	Jackson Immunoresearch	712-035-153
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	_____	Goat	1 : 500	Molecular Probes	A11008

## 7. Assaigs de supervivència cel·lular

### 7.1. Reducció d'MTT (assaig de viabilitat cel·lular)

El compost MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) és una sal de tetrazolium, de color groc, soluble en aigua. La reducció d'aquest compost és possible només per a cèl·lules metabòlicament viables a través de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa, donant lloc a un producte (la sal de formazà) que és insoluble en aigua. Un cop l'MTT es posa en contacte amb les cèl·lules, aquestes el capten i el redueixen. Llavors, s'allibera el formazà que es solubilitza amb dimetilsulfòxid (DMSO). La quantitat de formazà produït reflexa el metabolisme cel·lular i, per tant, l'absorbància de cada mostra és directament proporcional al nombre de cèl·lules viables.

Un cop realitzats els tractaments desitjats en plaques de 96 pous en un volum de medi de 50 µl, es van afegir 50 µl més de MTT (Sigma) diluït a 1mg/mL amb DMEM sense sèrum fetal boví, directament sobre les cèl·lules (sense aspirar prèviament el medi de cultiu), de manera que la concentració final del MTT resultar ser 0,5 mg / mL. Després de 30 minuts d'incubar les plaques a les condicions de cultiu usuals es va observar la formació de cristalls de formazà a les cèl·lules i es va procedir a aspirar el medi de tots els pous. Els cristalls van ser dissolts amb 50 µl de DMSO per pou i es va realitzar la mesura de l'absorbància en un lector de plaques BIO-TEK Power Wave XS a 590 nm i 620 nm. Els valors finals es van obtenir de la resta de la lectura de 620 nm a la de 590 nm. La viabilitat cel·lular es va expressar com a percentatge de cada condició respecte a les cèl·lules controls, no tractades. Cada mesura es va realitzar amb 4 replicats, com a mínim. Es va calcular la mitjana de cada condició i el seu error estàndard (SEM, de l'anglès, *standard error of the mean*) i es van representar les dades gràficament.

### 7.2. Assaig d'exclusió de Blau de Tripà

El Blau de Tripà, és un colorant vital utilitzat per tenyir selectivament, de color blau, les cèl·lules mortes. Les cèl·lules vives, que tenen les seves membranes cel·lulars intactes, no són permeables a aquest reactiu, ja que el Blau de Tripà no és capaç de travessar-les.

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous a una densitat de 150.000 cèl·lules / mL (0,5 mL per pou). Un cop realitzats els tractaments indicats, aquestes van ser recollides en 50 - 100 µL de PBS. Es van barrejar 8 µL de suspensió cel·lular amb 2 µL de Blau de Tripà (a una concentració final de 0,08 %). Es va realitzar el recompte de les cèl·lules emprant un hemocitòmetre i es va calcular el percentatge de cèl·lules blaves (mortes) respecte les cèl·lules totals. Per cada condició, es van realitzar triplicats. Es va calcular la mitjana de cada condició i el seu error estàndard i es van representar les dades gràficament.

## **8. Assaig de mort cel·lular**

### **8.1. Tinció nuclear amb Hoechst (33258, Sigma)**

El reactiu Hoechst 33258 és una molècula fluorescent utilitzada per tenyir l'ADN. Aquesta molècula també és coneguda com a bisBenzimida ([2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazole rihydrochloride]). La tinció de la cromatina amb Hoechst es pot utilitzar tant en cèl·lules vives com mortes, ja que el grup etil present en la seva estructura la converteix en una molècula lipofílica, permetent que travessi la membrana cel·lular intacta. Les propietats d'unió de l'ADN van ser ben caracteritzades per Churchill i Suzuki el 1989 (Churchill and Suzuki 1989).

Per a l'anàlisi de la morfologia nuclear apoptòtica, les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 96 pous on va ser tractades amb els tractaments indicats en cada cas o es van deixar sense tractar (controls) en un volum final de medi de 50µl. Per fixar les cèl·lules, es va afegir un volum de solució de fixació igual al volum del medi present en cada pouet (50µl), que contenia 4% de paraformaldehid diluït en el tampó PBS, contenint 0,2% de Tritó i 0,2 mg / mL de Hoechst 33258.

Després de 10 minuts a 4 ° C, les cèl·lules es van comptar utilitzant un microscopi de fluorescència Nikon ECLIPSE TE2000-E equipat amb llum ultraviolada, acoblat a una càmera fotogràfica Hamamatsu ORCA-ER. Els nuclis tenyits uniformement es van comptar com a cèl·lules sanes i viables, mentre que els nuclis condensats o fragmentats, es van comptar com a cèl·lules mortes (morfologia nuclear apoptòtica). El percentatge de mort apoptòtica va ser

obtingut amb el recompte de nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals (viables i apoptòtics). Es va calcular la mitjana i l'error estàndard de cada condició i es van representar les dades gràficament.

## 8.2. Tinció nuclear amb iodur de propidi

El reactiu iodur de Propidi (P4170, Sigma) és una molècula fluorescent utilitzada per tenyir l'ADN de cadena doble. Aquesta molècula també és coneguda com 3,8-Diamino-5-(3-diethylmethylamino)propyl)-6-phenyl phenanthridinium diiodide. El iodur de Propidi penetra i tenyeix les cèl·lules no viables, però no pot travessar la membrana de les cèl·lules viables.

Per a l'anàlisi de la mortalitat cel·lular, les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 96 pous on va ser tractades amb els tractaments indicats en cada cas o es van deixar sense tractar (controls) en un volum final de medi de 50µl. Per tenyir les cèl·lules, es va afegir un volum de solució de tinció igual al volum del medi present en cada pouet (50µl), que contenia 1µg/µl de iodur de propidi juntament amb 4 µg/µl de Hoechst permeable (3342, Invitrogen).

Després de 10 minuts a temperatura ambient, les cèl·lules es van observar i fotografiar *in vivo*, utilitzant un microscopi de fluorescència Nikon ECLIPSE TE2000-E equipat amb llum ultraviolada, acoblat a una càmera fotogràfica Hamamatsu ORCA-ER. El percentatge de mort cel·lular es va calcular amb el recompte de les cèl·lules mortes (tenyides amb iodur de propidi) respecte el de cèl·lules totals (nuclis tenyits amb Hoechst 3342). Es va calcular la mitjana de cada condició i el seu error estàndard i es van representar les dades gràficament.

## 9. Assaig d'activitat caspasa (DEVDasa)

Es va dur a terme la quantificació de les activitats caspasa-*like* de llisats cel·lulars. Després dels tractaments corresponents en plaques P60 o P100, les cèl·lules es van recollir i se'n van preparar extractes citosòlics tal i com s'ha explicat prèviament a l'apartat "5. Preparació d'extractes citosòlics". L'assaig d'activitat caspasa-*like* es va realitzar en pous d'una microplaca de 96 pous, utilitzant 20 µg de proteïna en un tampó específic que contenia 100 mM Tris (pH 7.2-7.4), 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 20 % sucrose, 10 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF i 40 µM del substrat fluorogènic Ac-DEVD-afc. La placa es va incubar a 35

°C, i les activitats caspasa-*like* es van mesurar després de 8 h d'incubació en un fluorímetre BIO-TEK Synergy HT amb un filtre d'excitació de 360 nm (40 nm d'ample de banda) i un filtre d'emissió de 530 nm (25 nm d'ample de banda). Per cada condició, es van realitzar triplicats, es va calcular mitjana de cada condició i el seu error estàndard i es van representar les dades gràficament.

## **10. Immunofluorescència de la translocació nuclear de RelA/p65**

Les cèl·lules es van sembrar en microplaques de 96 pous. Després de l'estimulació amb TNF $\alpha$ , les cèl·lules es van rentar amb PBS fred i es van fixar amb metanol 100 % durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es van realitzar 4 rentats amb PBS1x-0.5 % Tritó i seguidament es van bloquejar les mostres amb PBS1x-0,5 % Tritó – 1 % FBS (50 $\mu$ L / pou) durant 15 – 30 minuts. Es va aspirar la solució de bloqueig i es va incubar l'anticòs primari anti-p65 (C-20 sc-372, Santa Cruz Biotechnology) diluït 1 : 300 en una solució amb PBS1x-0,5 % Tritó durant tota la nit a 4 °C amb una agitació molt suau. L'endemà, es van rentar les mostres dues vegades amb PBS1x-0.5 % Tritó, es va afegir l'anticòs secundari Anti-rabbit Alexa fluor 488 a una dilució 1 : 500 diluït en una solució que contenia PBS1x-0,5 % Tritó + 0,1 % FBS i es va incubar durant 1 h a temperatura ambient. Es van rentar les mostres 3 vegades amb PBS1x-0.5 % Tritó i finalment un últim rentat amb PBS1x. Les cèl·lules es van observar i es van fer fotografies representatives utilitzant un microscopi de fluorescència Nikon ECLIPSE TE2000-E, acoblat a una càmera fotogràfica Hamamatsu ORCA-ER.

## **11. Assaig de la Luciferasa**

L'assaig de la Luciferasa s'utilitza com una eina molt sensible per avaluar expressió gènica, ja que l'enzim de la luciferasa és detectable en extractes de cèl·lules transfectades. Per fer-ho, s'utilitza un vector que contingui el gen que del qual es vol avaluar l'expressió gènica juntament amb una regió que conté la proteïna Luciferasa de la cuca de llum modificada i optimitzada per tal de poder monitoritzar l'activitat transcripcional en cèl·lules eucariotes transfectades. La Luciferasa catalitza l'oxidació de la D-luciferina en oxililuciferina en presència d'ATP, Mg<sup>2+</sup> i O<sub>2</sub>, donant lloc a l'emissió de fotons. L'activitat reporter, s'aconsegueix immediatament després de la traducció, ja que la proteïna no requereix modificacions post-traduccionals.

El vector utilitzat per l'assaig *reporter* de la Luciferasa va ser pGL3-basic (Promega). Les cèl·lules es van tractar amb TNF $\alpha$  i després de 6 h les plaques de cultiu es van rentar una vegada amb PBS1x i es va procedir a realitzar l'assaig amb el kit Luciferase Assay Kit (Promega) seguint les indicacions del fabricant. Així, les cèl·lules es van recollir en 100  $\mu$ L del tampó de llisi de l'assaig, prèviament diluït en aigua. L'emissió de llum es va quantificar amb un luminòmetre. Els valors obtinguts es van analitzar i es van normalitzar en relació a la concentració de proteïna (RLU /  $\mu$ g de proteïna) (RLU, de l'anglès, *relative light units*). Es van calcular les mitjanes de les diferents mostres i el seu error estàndard i es van representar les dades gràficament.

## 12. Anàlisi estadístic

Tots els experiments es van repetir al menys tres vegades. Els valors estan expressats com a mitges  $\pm$  SEM. Es va aplicar un test-F per avaluar si les variàncies de les mostres a comparar eren iguals o no. En funció d'això, es van realitzar els tests de la t d'Student per mostres amb variàncies iguals o diferents per poder determinar la significança estadística dels mesuraments de supervivència i mort. Es va considerar: \* P<0.01, \*\* P<0.005 i \*\*\* P<0.001.







*IV.*

Resultats



# Capítol 1

Estudi dels mecanismes involucrats  
en la mort cel·lular induïda per  $\text{TNF}\alpha$   
en un context on  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  està inhibit



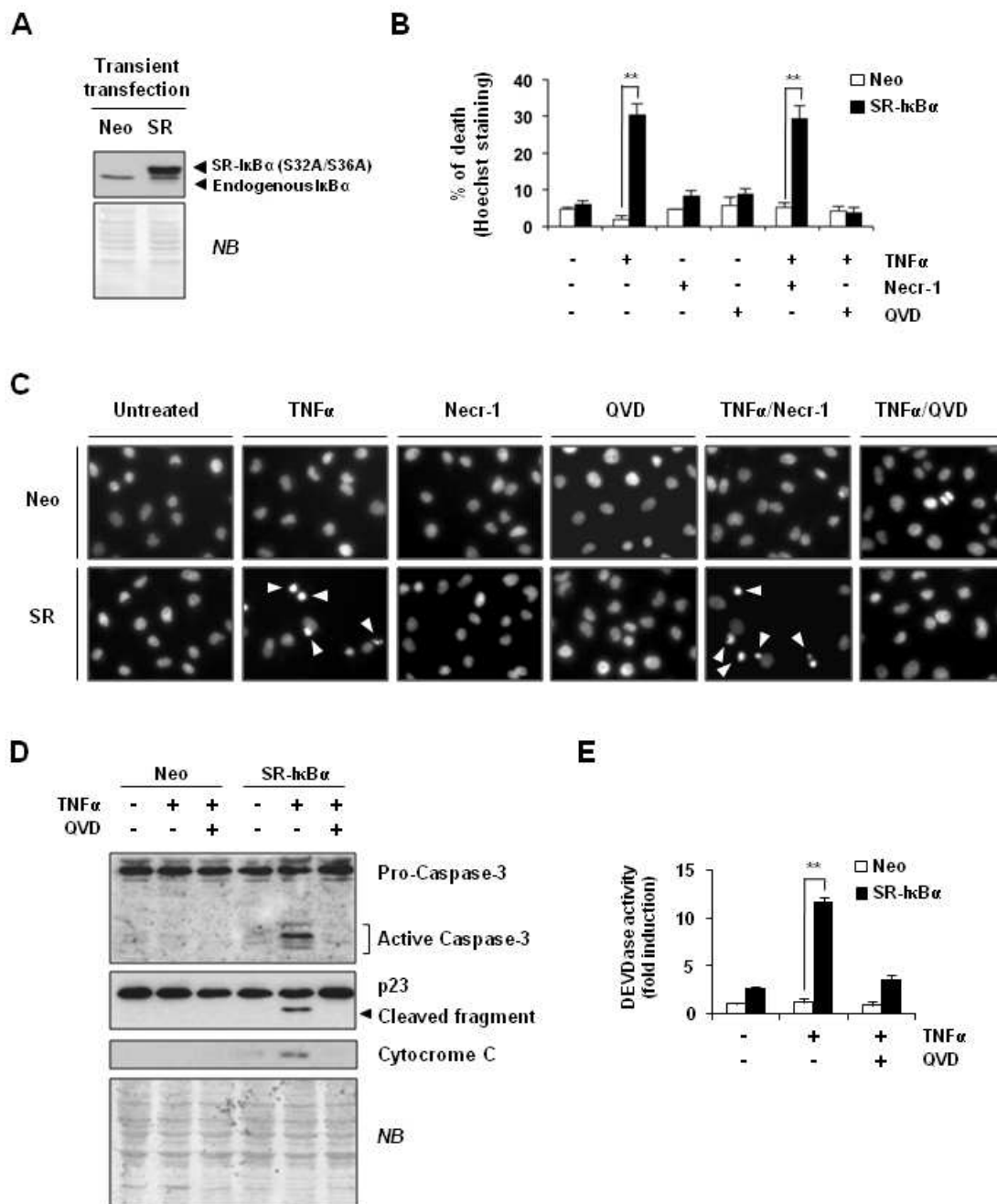
TNF $\alpha$  pot desencadenar tant supervivència com mort cel·lular (Micheau and Tschopp 2003). Es coneix que la supervivència cel·lular està directament relacionada amb l'activació de NF- $\kappa$ B, mentre que la mort cel·lular ocorre quan aquest factor de transcripció es troba inhibït (Beg and Baltimore 1996, Van Antwerp, Martin *et al.* 1996, Wang, Mayo *et al.* 1996). La majoria de les cèl·lules que són resistents a la mort induïda per TNF $\alpha$ , són cèl·lules de tipus II, on l'alliberament de factors pro-apoptogènics de la mitocondria és essencial per amplificar la cascada citotòxica (Kantari and Walczak 2011). És per tot això que la inhibició d'NF- $\kappa$ B i l'activació dels factors pro-apoptogènics podrien ser processos interconnectats en el mecanisme d'activació de mort cel·lular (Le Bras, Rouy *et al.* 2006).

Tal i com s'ha detallat als objectius, els nostres estudis es van centrar inicialment en abordar les qüestions que es derivaven a partir dels resultats previs del grup (Gozzelino, Sole *et al.* 2008): analitzar en una línia cel·lular que expressés tots els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 si les vies de supervivència controlades per Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B estaven relacionades i estudiar la funció de cadascun dels membres anti-apoptòtics en la mort induïda per TNF $\alpha$ . Per això, vam escollir un model cel·lular àmpliament acceptat com són les cèl·lules HeLa ja que, a més, s'ha descrit que expressen Bcl-2 tal i com es mostrarà a continuació.

### **1.1. TNF $\alpha$ indueix apoptosi, i no necroptosi, en cèl·lules HeLa que sobre-expressen el SR-I $\kappa$ B $\alpha$**

Com a punt de partida, vam decidir estudiar els mecanismes involucrats en la mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$  en un context on NF- $\kappa$ B estigués inhibït, per tal d'evitar la inducció de supervivència per part de la citoquina. Per fer-ho, les cèl·lules HeLa es van transfectar amb un súper-repressor d'NF- $\kappa$ B (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ -pcDNA3 (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ )) o bé amb un vector control pcDNA3 (Neo) (Figura R1A). Com es mostra a la Figura R1B, la transfecció amb el SR-I $\kappa$ B $\alpha$  no va alterar la viabilitat de les cèl·lules HeLa, però sí que les va sensibilitzar a la mort induïda per TNF $\alpha$  (Figura R1B). La mort cel·lular induïda per la citoquina va poder ser previnguda per l'addició al medi de cultiu de q-VD-OPh (un inhibidor de

caspsases d'ampli espectre), però no de Necrostatina-1 (un inhibidor de la necroptosi). En concordança, les cèl·lules que morien per l'acció combinada de la sobre-expressió del SR-IκBα i de l'estímul de TNFα, van exhibir la morfologia nuclear típica apoptòtica, tal i com es va poder demostrar amb la tinció de la cromatina amb el colorant bis-benzimida de Hoechst (Figura R1C).



**Figura R1. L'expressió forçada del SR-IkBa sensibilitza les cèl·lules HeLa a la mort induïda per TNF $\alpha$ , permetent la senyalització apoptòtica intracel·lular.** Les cèl·lules HeLa es van transfectar amb un vector buit pcDNA3 (Neo) o amb el vector pcDNA3-SR-IkBa (SR or SR-IkBa). (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna i es van analitzar per *Western blot* utilitzant un anticòs contra IkBa. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules Neo (barres blanques) o SR-IkBa (barres negres) es van deixar sense tractar (-) o van ser tractades (+) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  i / o 10  $\mu$ M de Necrostatina-1 (Nec-1) o 20  $\mu$ M de q-VD-OPh (QVD) durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant els nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals tenyits amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). (D-E) Els extractes citosòlics van ser obtinguts de cèl·lules Neo o SR-IkBa que es van deixar sense tractar (-) o van ser tractades (+) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  o amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  i 20  $\mu$ M de q-VD-OPh. (D) Mitjançant *Western blot* es van analitzar el processament de la pro-caspasa-3 en el seu fragment actiu, el processament dependent de caspases de la co-xaperona p23 i l'alliberament de citocrom c al citosol. (E) Les activitats caspasa-3-like es van mesurar utilitzant el reactiu fluorogènic Ac-DEVD-afc\*\*. P<0.005.

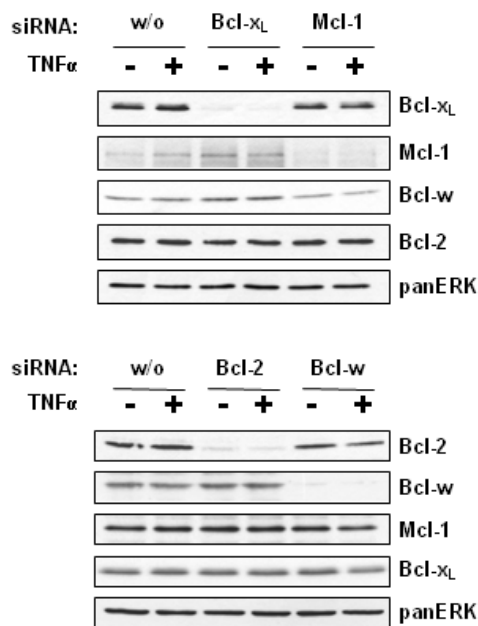
Això es va veure corroborat per un correcte processament de la pro-caspasa-3 en els seus fragments actius, així com pel processament específic d'un substrat de caspases com és la co-xaperona p23 i per l'alliberament de citocrom c de la mitocòndria cap al citosol (Figura R1D). L'addició de q-VD-OPh al medi de cultiu va eliminar per complet la senyalització apoptòtica induïda per TNF $\alpha$  (Figura R1D). Per últim, la mort cel·lular observada en cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$  i sobre-expressores del SR-IkBa, era dependent de l'activació de les caspases (Figura R1E). Aquests resultats indiquen que la sobre-expressió del SR-IkBa en cèl·lules HeLa, és suficient per permetre l'activació de la via apoptòtica regulada per TNF $\alpha$ . A més a més, aquest procés involucra l'activació de les caspases i l'alliberament del citocrom c de la mitocòndria cap al citosol.

## **1.2. La baixada d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> és suficient per sensibilitzar les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$**

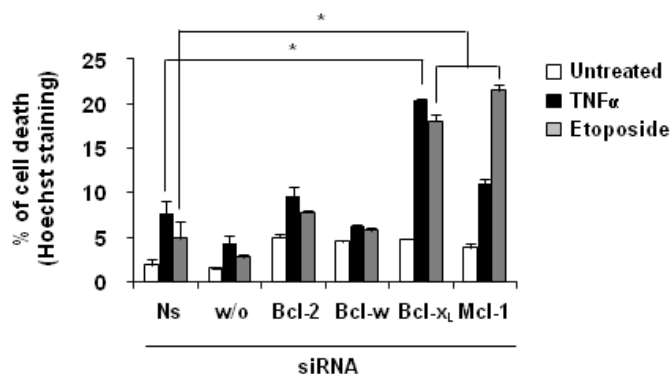
El fet que el citocrom c s'alliberés com a conseqüència del tractament amb TNF $\alpha$  en cèl·lules HeLa que sobre-expressaven el SR-IkBa (Figura R1D), suggeria que la homeòstasi mitocondrial podria jugar un paper important en la sensibilització que la sobre-expressió del SR-IkBa provocava sobre l'efecte

citotòxic de TNF $\alpha$ . Donat que les proteïnes de la família de Bcl-2 regulen la homeòstasi mitocondrial, que les cèl·lules HeLa expressen els quatre membres anti-apoptòtics principals (Figura R2A), i que no existeixen publicacions concloents en relació a la contribució individual de cada membre anti-apoptòtic d'aquesta família en el procés de supervivència cel·lular induït per TNF $\alpha$ , vam voler estudiar si el silenciament individual de cadascuna d'aquestes proteïnes anti-apoptòtiques podria sensibilitzar les cèl·lules HeLa a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$ . Amb aquest propòsit, es van dissenyar RNAs d'interferència curts (d'ara en endavant, siRNAs, de l'anglès, *short interference RNA*) específics contra Bcl-x<sub>L</sub> humà (Bcl-x<sub>L</sub> siRNA), Mcl-1 humà (Mcl-1 siRNA), Bcl-2 humà (Bcl-2 siRNA) o Bcl-w humà (Bcl-w siRNA).

**A**



**B**

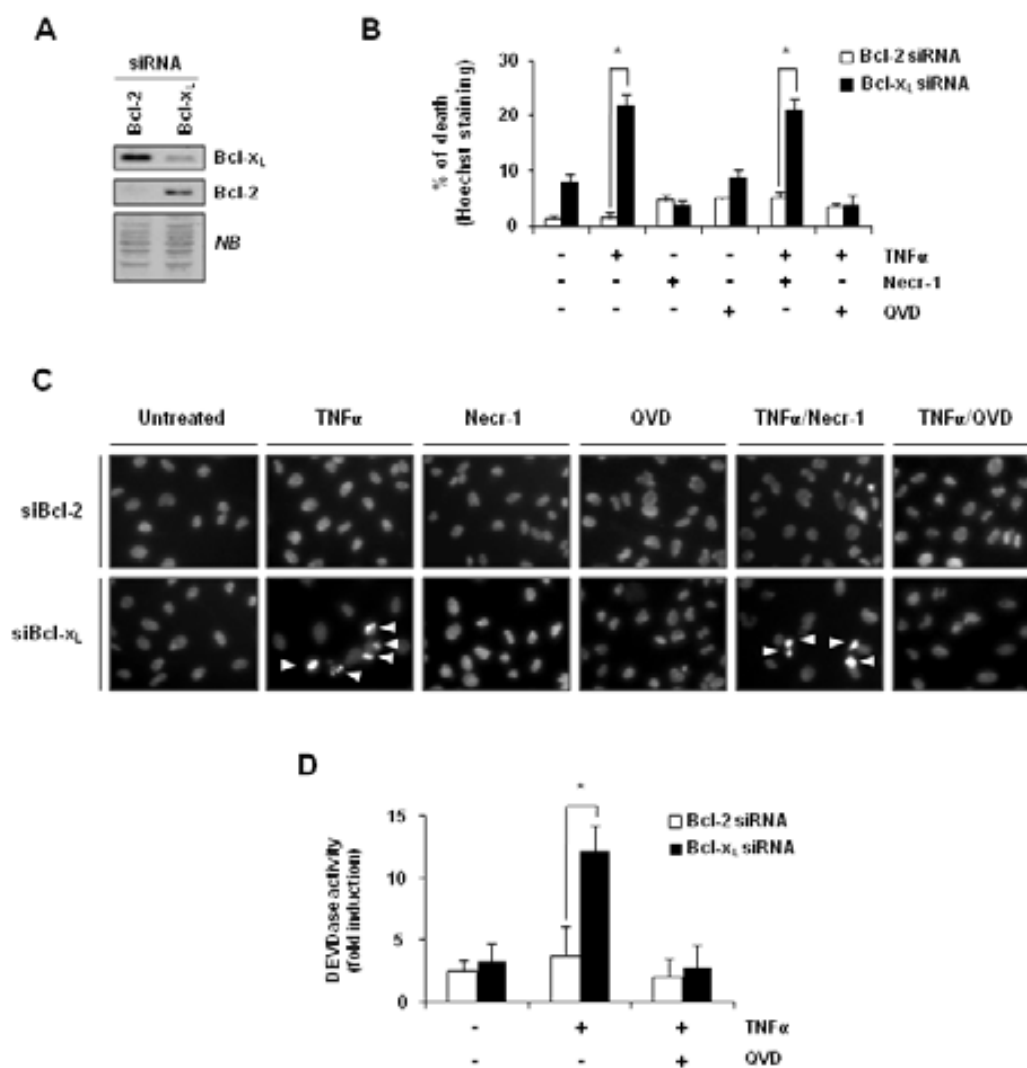




**Figura R2.** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w, sensibilitza les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per l'activació tant de la via extrínseca com de la via intrínseca. Les cèl·lules HeLa van ser transfectades amb o sense (w/o, de l'anglès *without*) una seqüència curta de RNA d'interferència (siRNA) contra Bcl-x<sub>L</sub> humà (Bcl-x<sub>L</sub> siRNA), Mcl-1 humà (Mcl-1 siRNA), Bcl-2 humà (Bcl-2 siRNA) o Bcl-w humà (Bcl-w siRNA), o una seqüència sense sentit (Ns siRNA, de l'anglès *Non sense*) durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules no tractades (-) o tractades (+) amb 100 ng/mL de TNFα durant 24 h. Els nivells de proteïna de Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2 i Bcl-w van ser analitzats per *Western blot*, confirmant així els silenciaments específics. Les membranes es van incubar de nou amb un anticòs anti-panERK per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar (barres blanques) o van ser tractades amb 100 ng/mL de TNFα (barres negres) o amb 30 μM d'Etopòsid (barres grises) durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. \*P<0.01. (Aquesta figura està parcialment recollida dins de la tesi de la Dra. Raffaella Gozzelino (2007)).

Com es mostra a la Figura R2A, tots els siRNAs van demostrar ser eficients a l'hora de reduir la quantitat total de proteïna del seu gen diana sense afectar als altres membres anti-apoptòtics de la família. Seguidament, vam voler comprovar el seu impacte en l'acció citotòxica de TNFα. En comparar les cèl·lules transfectades amb els diferents siRNAs amb un siRNA sense sentit (Ns siRNA, de l'anglès *nonsense siRNA*), vam veure que el siRNA dissenyat contra Bcl-x<sub>L</sub> va resultar ser el més efectiu i l'únic que sensibilitzava les cèl·lules a l'insult citotòxic de TNFα de forma significativa (Figura R2B, barres negres).

Al 2003, es va publicar que per sensibilitzar les cèl·lules HeLa a un estímul apoptòtic intrínsec com l'etopòsid, és necessari que Mcl-1 es degradi (Nijhawan, Fang *et al.* 2003). Donat que en les nostres condicions experimentals el silenciament de Mcl-1 no va resultar ser tant efectiu com el de Bcl-x<sub>L</sub> per sensibilitzar les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per TNFα, vam voler comprovar si el silenciament de Mcl-1 que estàvem assolint era suficient per a que concentracions subletals d'etopòsid (30 μM) fossin tòxiques. Tal i com es mostra a la Figura R2B, tant el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> com el de Mcl-1 va sensibilitzar les cèl·lules a l'apoptosi induïda per etopòsid. En efecte, el percentatge d'apoptosi induïda per l'etopòsid va ser de 18,1±0,75 % i 21,4±0,67 % en cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub>- i Mcl-1 silenciats, respectivament (Figura R2B).



**Figura R3.** La mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules que tenen Bcl-x<sub>L</sub> silenciada és dependent de caspases. Les cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules silenciades per Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> i van ser analitzats per *Western blot* utilitzant anticossos anti-Bcl-2 i anti-Bcl-x<sub>L</sub> per comprovar la correcta disminució de les proteïnes. La membrana es va tenyir amb naphthol blue (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules transfectades amb Bcl-2 siRNA (barres blanques) o amb Bcl-x<sub>L</sub> siRNA (barres negres) es van deixar sense tractar (-) o van ser tractades (+) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  i / o 10  $\mu$ M de Necrostatina-1 (Nec-1) o 20  $\mu$ M de q-VD-OPh (QVD) durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals tenyits amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). (D) Els extractes citosòlics van ser obtinguts de cèl·lules amb Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> silenciada que es van deixar sense tractar (-) o van ser tractades (+) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  o amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  i 20  $\mu$ M de q-VD-OPh. Les activitats caspasa-3-like es van mesurar utilitzant el reactiu fluorogènic Ac-DEVD-afc.\* P<0.01.

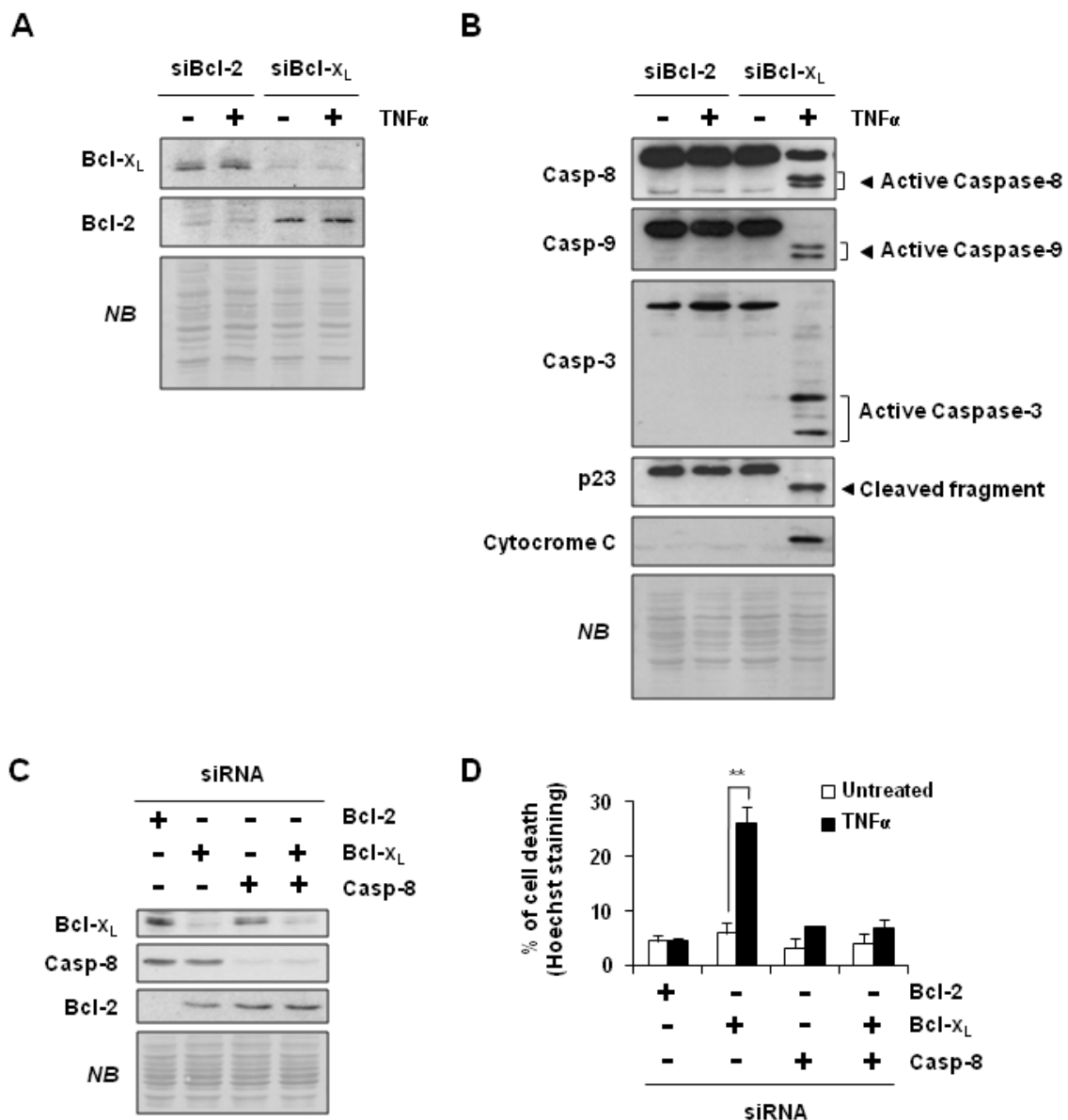
En aquest sentit, les cèl·lules HeLa transfectades amb el siRNA de Mcl-1 van resultar ser dues vegades més sensibles a etopòsid que a TNF $\alpha$  ( $21,4\pm 0,67\%$  i  $11,0\pm 0,50\%$ , respectivament) (Figura R2B). Per contra, el percentatge d'apoptosi en les cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciades després del tractament amb TNF $\alpha$  o etopòsid va resultar ser comparable ( $20,3\pm 0,20\%$  o  $18,1\pm 0,75\%$ , respectivament) (Figura R2B). En conjunt, els resultats obtinguts revelen que la disminució de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> és suficient per decantar la balança des de la supervivència cap a la mort cel·lular en front al tractament amb TNF $\alpha$ . Això indica que aquesta proteïna és necessària i suficient per controlar el comportament de les cèl·lules HeLa en resposta a aquesta citocina.

### **1.3. TNF $\alpha$ induïx apoptosi, i no necroptosi, en cèl·lules HeLa quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada**

Un cop assignada Bcl-x<sub>L</sub> com a molècula clau a l'hora de conferir resistència en front a la citotoxicitat promoguda per TNF $\alpha$ , vam voler estudiar els mecanismes d'aquesta mort cel·lular. A partir d'aquí, i en tots els experiments que es van realitzar i que es presentaran en aquest primer capítol, es va utilitzar el siRNA contra Bcl-2 com a control negatiu, ja que els percentatges d'apoptosi observats en front a l'estímul de TNF $\alpha$  van ser comparables a aquells obtinguts amb el siRNA sense sentit (Ns siRNA) (Figura R2B). A més a més, a diferència del Ns siRNA, podem assegurar l'efectivitat del siRNA contra Bcl-2 analitzant la baixada dels nivells proteics per *Western blot*.

Com es mostra a la Figura R3B, i contràriament al que observem en les cèl·lules que tenien Bcl-2 silenciada (Figura R3A), les cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciada (Figura R3A) van esdevenir sensibles a la mort induïda per TNF $\alpha$ . A més, l'addició al medi de cultiu de q-VD-OPh, però no de Necrostatina-1, va prevenir la mort cel·lular, indicant que el procés d'apoptosi es trobava actiu (Figura R3B). Aquests resultats van ser confirmats amb l'observació de morfologies apoptòtiques nuclears en cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$  (Figura R3C). Com era d'esperar, TNF $\alpha$  va induir també activitats caspasa-*like* en cèl·lules amb nivells disminuïts de Bcl-x<sub>L</sub>, que van ser revertides per l'addició de q-VD OPh al medi de cultiu (Figura R3D). Amb l'objectiu de corroborar que la cascada intracel·lular de

caspsases s'estava activant, vam exposar cèl·lules HeLa amb Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> silenciats (Figura R4A) a l'estímul de TNF $\alpha$ . Mitjançant *Western blot*, vam detectar que després del tractament amb TNF $\alpha$  només les cèl·lules amb nivells disminuïts de Bcl-x<sub>L</sub> exhibien un processament adequat de pro-caspasa-8, pro-caspasa-9 i pro-caspasa-3, corroborat, a més a més, pel processament de la co-xaperona p23. De la mateixa manera, només en aquestes cèl·lules es desencadena l'alliberament de citocrom c de la mitocondria en tractar-les amb TNF $\alpha$  (Figura. R4B).

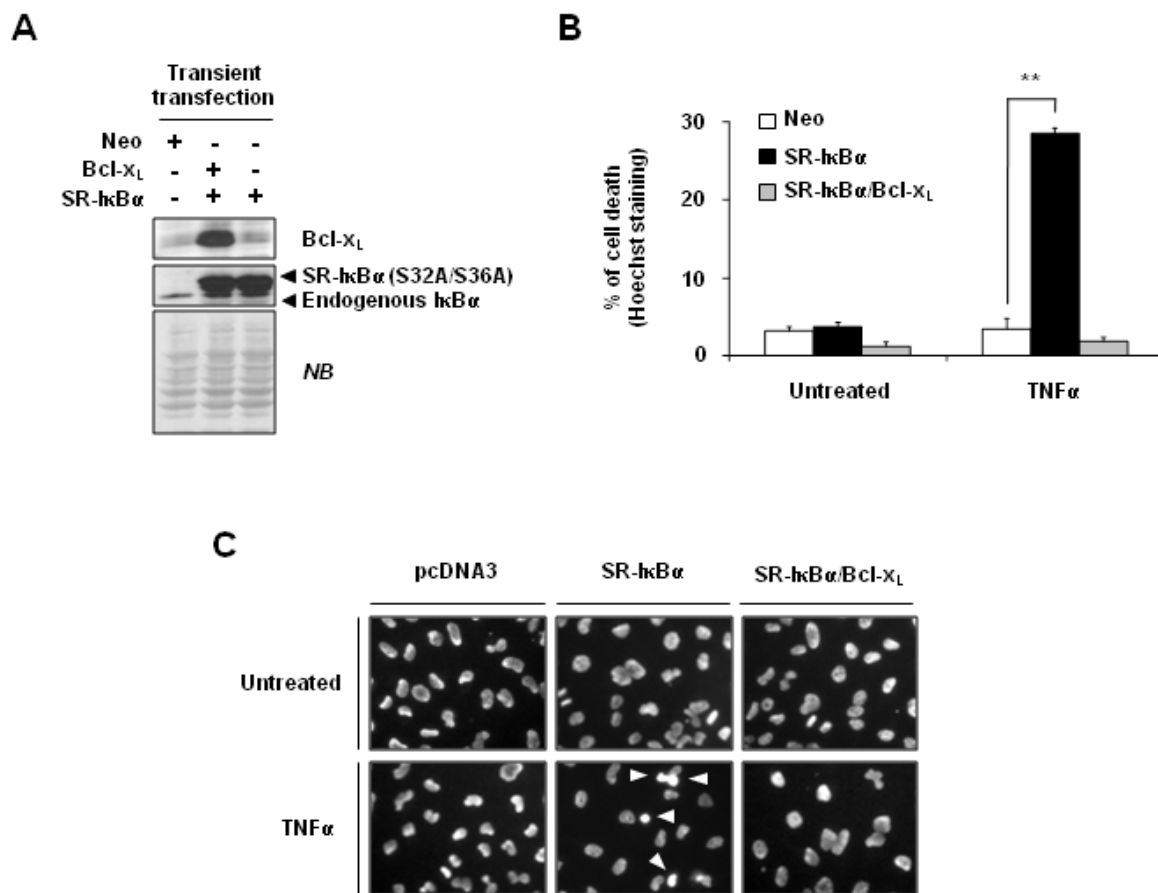


**Figura R4. L'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> requereix l'activació inicial de caspasa-8.** (A, B) Les cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules sense tractar (-) o tractades (+) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  durant 24 h i es van analitzar per Western blot. Es van utilitzar anticossos anti-Bcl-x<sub>L</sub> i anti-Bcl-2 per demostrar la disminució dels nivells proteics. La membrana es va tenyir amb naphtol blue per assegurar una càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules van ser tractades com en (A) i es van obtenir llisats proteics citosòlics. Mitjançant *Western blot*, es van analitzar el processament de la pro-caspasa-8, la pro-caspasa-9 i la pro-caspasa-3 en els seus fragments actius, el processament de p23 induït per caspases i l'alliberament del citocrom c al citosol. La membrana es va tenyir amb naphtol blue (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (C, D) Les cèl·lules HeLa es van transfectar durant 3 dies amb els siRNAs contra Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, caspasa-8 o Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8 alhora. (C) Es van obtenir llisats totals de proteïna i els nivells de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i pro-caspasa-8 es van analitzar per *Western blot*. La membrana es van tenyir amb naphtol blue (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (D) Les cèl·lules es van tractar (barres negres) o no (barres blanques) amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. \*\* P<0.005.

Per tal d'estudiar si la caspasa-8 es requeria com a caspasa iniciadora en la mort induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules amb nivells disminuïts de Bcl-x<sub>L</sub>, es van transfectar les cèl·lules HeLa amb el siRNA de Bcl-2, el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub>, el siRNA de caspasa-8 o una combinació dels siRNAs de Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8 (Figura R4C). Com es pot veure a la Figura R4D, el siRNA contra caspasa-8 va evitar per complet la mort induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules que tenien silenciada Bcl-x<sub>L</sub>. El conjunt d'aquests resultats demostra que l'activació de caspasa-8 és necessària perquè TNF $\alpha$  promogui la mort cel·lular quan Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada.

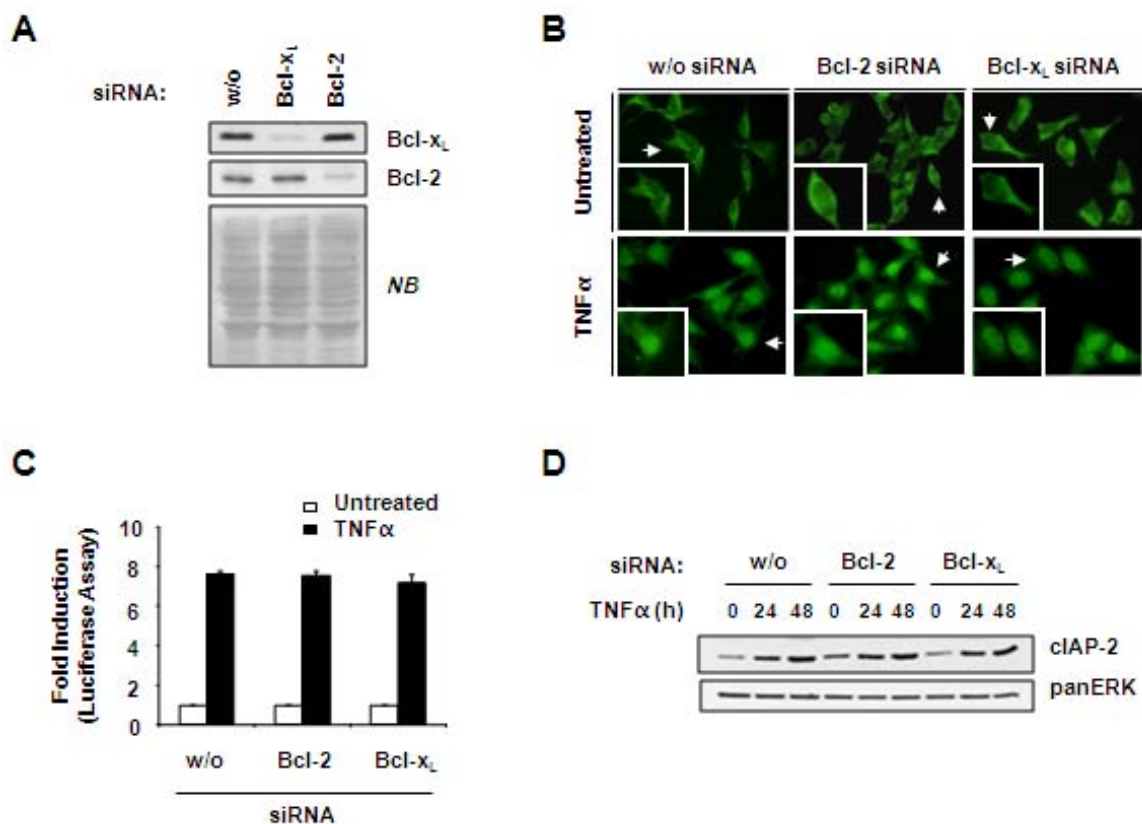
#### **1.4. La mort induïda per TNF $\alpha$ ocorre encara que NF- $\kappa$ B sigui funcional en cèl·lules HeLa on s'han silenciats els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>**

Els resultats anteriors van demostrar que, tant la sobre-expressió del SR- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Figura R1), com el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, eren capaços de sensibilitzar les cèl·lules HeLa a la mort apoptòtica induïda per TNF $\alpha$ . Donat que s'ha descrit que Bcl-x<sub>L</sub> pot modular positivament la via d'NF- $\kappa$ B en cèl·lules de glioblastoma (Gabellini, Castellini *et al.* 2008), ens vam interessar per estudiar si Bcl-x<sub>L</sub> podia estar influenciant l'estat d'activació d'NF- $\kappa$ B promoguda per TNF $\alpha$  en el nostre model cel·lular.



**Figura R5. La sobre-expressió de Bcl-x<sub>L</sub> evita la mort induïda per TNFα en cèl·lules que sobre-expressen el SR-IκBα.** Les cèl·lules HeLa es van transfectar amb un vector buit pcDNA3-buit (Neo), amb pcDNA3-SR-IκBα (SR or SR-IκBα) o es van co-transfectar amb pcDNA3-SR-IκBα i pcDNA3-Bcl-x<sub>L</sub> (SR-IκBα/Bcl-x<sub>L</sub>). (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules transfectades (+) o no (-) que van ser analitzats per *Western blot* utilitzant anticossos contra IκBα i Bcl-x<sub>L</sub>. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules Neo (barres blanques), SR-IκBα (barres negres) o SR-IκBα/Bcl-x<sub>L</sub> (barres grises) es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL de TNFα durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). \*\* P<0.005.

D'una banda, la Figura R5B mostra que l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules transfectades amb el SR-IkB $\alpha$  es va evitar completament amb la sobreexpressió de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura R5A). Aquest fet va ser confirmat amb l'observació de morfologies nuclears apoptòtiques en les cèl·lules que havien estat tractades amb TNF $\alpha$  (Figura R5C). Com es mostra a la Figura R6B, la translocació nuclear de RelA/p65 no es va veure alterada pel tractament amb TNF $\alpha$ , independentment del siRNA utilitzat i, per tant, dels nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura R6A). A més a més, l'assaig de la luciferassa va demostrar que l'activitat d'NF- $\kappa$ B induïda per TNF $\alpha$  no es trobava alterada en les cèl·lules transfectades amb els diferents siRNAs (Figura R6C). Finalment, es va analitzar la funció de transcripció endògena d'NF- $\kappa$ B a través de l'anàlisi dels nivells de la proteïna cIAP2 quan les cèl·lules eren tractades amb TNF $\alpha$ . Tal i com s'esperava, els nivells d'expressió de cIAP2 van incrementar en les cèl·lules estimulades amb TNF $\alpha$  independentment del siRNA emprat, mentre que els nivells d'expressió de ERK, un gen que no es troba sota control d'NF- $\kappa$ B (Pahl 1999), no van ser alterats (Figura R6D).



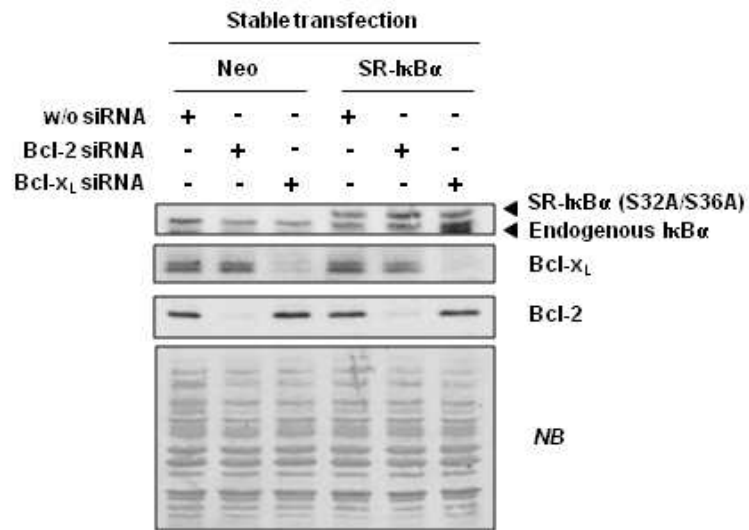
**Figura R6. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitza les cèl·lules a la mort induïda per TNF $\alpha$  sense afectar l'activitat de NF- $\kappa$ B.** Les cèl·lules HeLa van ser transfectades sense siRNA (w/o) o amb els siRNAs de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna i els nivells d'expressió de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> es van analitzar per *Western blot*, confirmant l'especificitat dels silenciaments respectius. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 6 h. Es van realitzar immunofluorescències per detectar la subunitat d'NF- $\kappa$ B RelA/p65. Es mostren imatges representatives en baixa i alta magnificació (les fletxes indiquen les cèl·lules seleccionades que s'han ampliat). (C) Les cèl·lules es van transfectar amb els siRNAs de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> o no es van transfectar (w/o) durant 3 dies. Posteriorment, les cèl·lules es van transfectar de forma transitòria amb un vector reportador, que conté una seqüència promotora capaç de ser reconeguda per NF- $\kappa$ B, seguit del gen que codifica per la luciferassa. Després de 24 h, les cèl·lules es van deixar sense tractar (barres blanques) o van ser tractades (barres negres) amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$  durant 6 h i es va mesurar l'activitat luciferassa en llistats cel·lulars. (D) Llistats totals de proteïnes es van obtenir de cèl·lules sense tractar (0 h) o de cèl·lules tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 o 48 h. Els nivells d'expressió de cIAP2 i panERK (com a control de càrrega) van ser analitzats per *Western blot*.

### **1.5. Bcl-x<sub>L</sub> i NF- $\kappa$ B exerceixen els seus rols protectors respectius a través d'una via intracel·lular compartida**

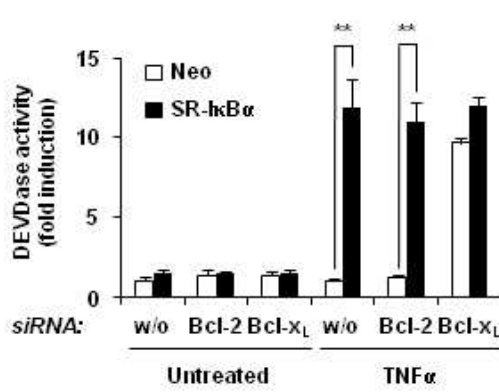
Per tal de conèixer la relació entre la citoprotecció regulada per Bcl-x<sub>L</sub> o per NF- $\kappa$ B, els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> van ser regulats a la baixa en cèl·lules transfectades de forma estable amb el vector buit (Neo) o el SR-I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura R7A). Com es mostra a les Figures R7B (activitat caspasa) i R7C (percentatge de nuclis apoptòtics), el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no va comportar un increment en l'apoptosi promoguda per TNF $\alpha$  en cèl·lules que sobre-expressen el SR-I $\kappa$ B $\alpha$ . A més, la morfologia nuclear apoptòtica observada en front a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$  era la mateixa tant en cèl·lules transfectades amb el SR-I $\kappa$ B $\alpha$  com en cèl·lules que sobre-expressaven el SR-I $\kappa$ B $\alpha$  i en les quals també es va silenciar Bcl-x<sub>L</sub> (Figura R7D).



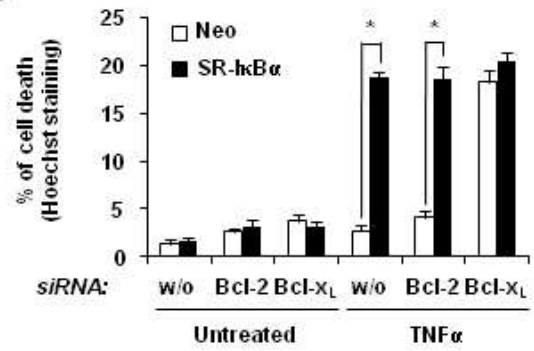
**A**



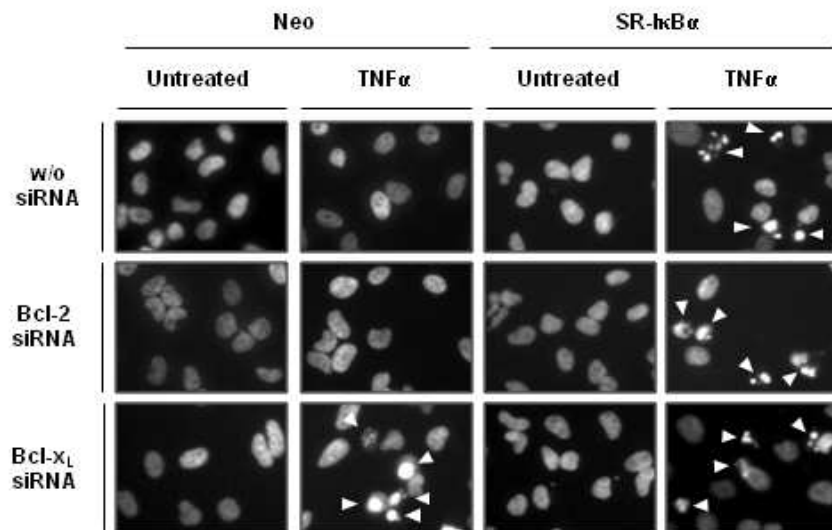
**B**



**C**



**D**

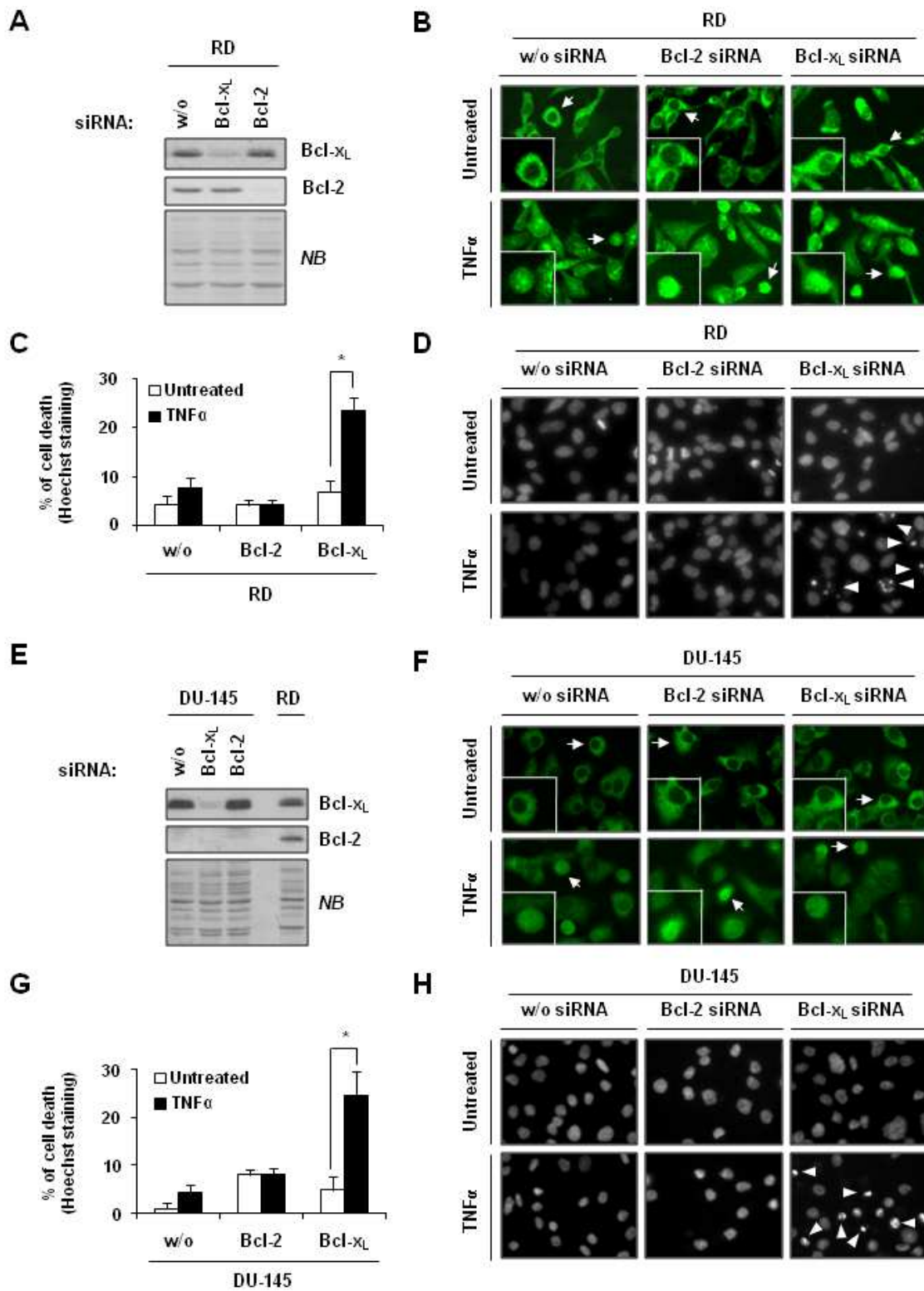


**Figura R7. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no comporta una major sensibilització en front a la citotoxicitat induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules sobre-expressores del SR-IkB $\alpha$ .** Les cèl·lules HeLa es van transfectar de forma estable amb un vector buit pcDNA3 (Neo) o amb el vector pcDNA3-SR-IkB $\alpha$  (SR or SR-IkB $\alpha$ ). Aquestes cèl·lules, Neo o SR-IkB $\alpha$ , van ser transfectades de nou o no (w/o) durant 3 dies amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub>. A) Es van obtenir llisats totals proteics i es van analitzar per *Western blot* utilitzant anticossos contra IkB $\alpha$ , Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>. La membrana es va tenyir amb *naphtol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules Neo (barres blanques) o SR-IkB $\alpha$  (barres negres), transfectades amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> o sense (w/o) siRNA, es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 h. Es van obtenir extractes citosòlics i es van mesurar les activitats caspasa-3-*like* utilitzant el reactiu fluorogènic Ac-DEVD-afc. (C) Les cèl·lules van ser tractades com en (B) i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (D) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). \* P<0.01 and \*\* P<0.005.

### **1.6. La mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$ en cèl·lules RD i DU-145 on Bcl-x<sub>L</sub> s'ha silenciat ocorre malgrat que NF- $\kappa$ B es mantingui funcional**

Els resultats anteriors demostren que Bcl-x<sub>L</sub> és una proteïna crucial que permet la supervivència cel·lular independentment de l'activació de NF- $\kappa$ B en cèl·lules HeLa. Per tal de validar que no es tractava d'un efecte restringit a aquestes cèl·lules, vam voler corroborar els resultats obtinguts en altres tipus cel·lulars com les cèl·lules RD (línia cel·lular derivada de rhabdomiosarcoma embrionari humà) i les cèl·lules DU-145 (línia cel·lular de carcinoma de pròstata humà). Tant Bcl-x<sub>L</sub> com Bcl-2 van ser silenciats eficientment en cèl·lules RD (Figura R8A). Com es mostra a la Figura R8B, cap dels siRNAs utilitzats va impedir la translocació nuclear d'NF- $\kappa$ B després del tractament amb TNF $\alpha$ , tot i que el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Bcl-2, va ser capaç de sensibilitzar les cèl·lules a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$  (Figures R8C i R8D). Utilitzant les cèl·lules DU-145 es van aconseguir les mateixos resultats. Així, en primer lloc, vam analitzar, mitjançant *Western blot*, els nivells de baixada de l'expressió tant de Bcl-2 com de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura R8E). En aquest cas, com que vam observar que aquestes cèl·lules no expressaven Bcl-2 (Figura R8E), vam utilitzar les cèl·lules RD com a control positiu de l'expressió de Bcl-2 (Figura R8E). Aleshores, vam detectar que només el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>, però no contra Bcl-2, era capaç de sensibilitzar les cèl·lules DU-145 a l'apoptosi regulada per TNF $\alpha$  (Figures R8G i

R8H). Tal i com ja s'havia observat en les cèl·lules HeLa o RD, el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no va alterar l'estat d'activació d'NF-κB (Figura R8F).



**Figura R8. Les cèl·lules RD i DU-145 esdevenen sensibles a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada, sense afectar l'activitat de NF- $\kappa$ B.** (A–D) Les cèl·lules RD van ser transfectades o no (w/o) amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna i els nivells proteics de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> es van analitzar per *Western blot*. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 6 h. Es van realitzar immunofluorescències per detectar la subunitat d'NF- $\kappa$ B, RelA/p65. Es mostren imatges representatives amb baixa i alta magnificació (les fletxes indiquen les cèl·lules seleccionades que s'han ampliat). (C) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (D) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). (E–H) Les cèl·lules DU-145 van ser transfectades amb els siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> o sense (w/o) siRNA durant 3 dies. (E) Es van obtenir llisats totals de proteïna i els nivells proteics de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> es van analitzar per *Western blot*. Les cèl·lules RD sense transfectar van ser utilitzades com a control positiu de l'expressió de Bcl-2. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (F) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 6 h. Es van realitzar immunofluorescències com en (B). (G) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular es va calcular com en (C). (H) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). \* P<0.01.

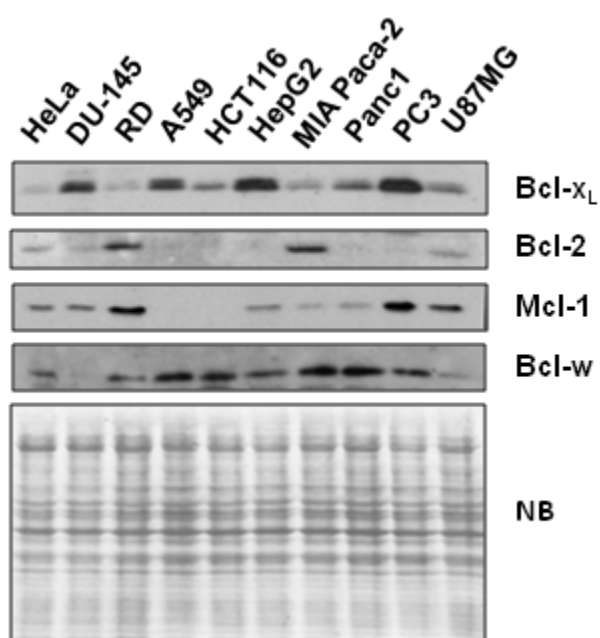
En conjunt, els resultats exposats en aquest primer capítol de la tesi, suggereixen que, en primer lloc, Bcl-x<sub>L</sub> permet la supervivència cel·lular encara que NF- $\kappa$ B no sigui funcional i, en segon lloc, que NF- $\kappa$ B no pot exercir el seu paper protector si la l'activitat de Bcl-x<sub>L</sub> es veu alterada.

## Capítol 2

Anàlisi de l'efecte de sensibilització  
a la mort induïda per  $\text{TNF}\alpha$   
produït pel silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>

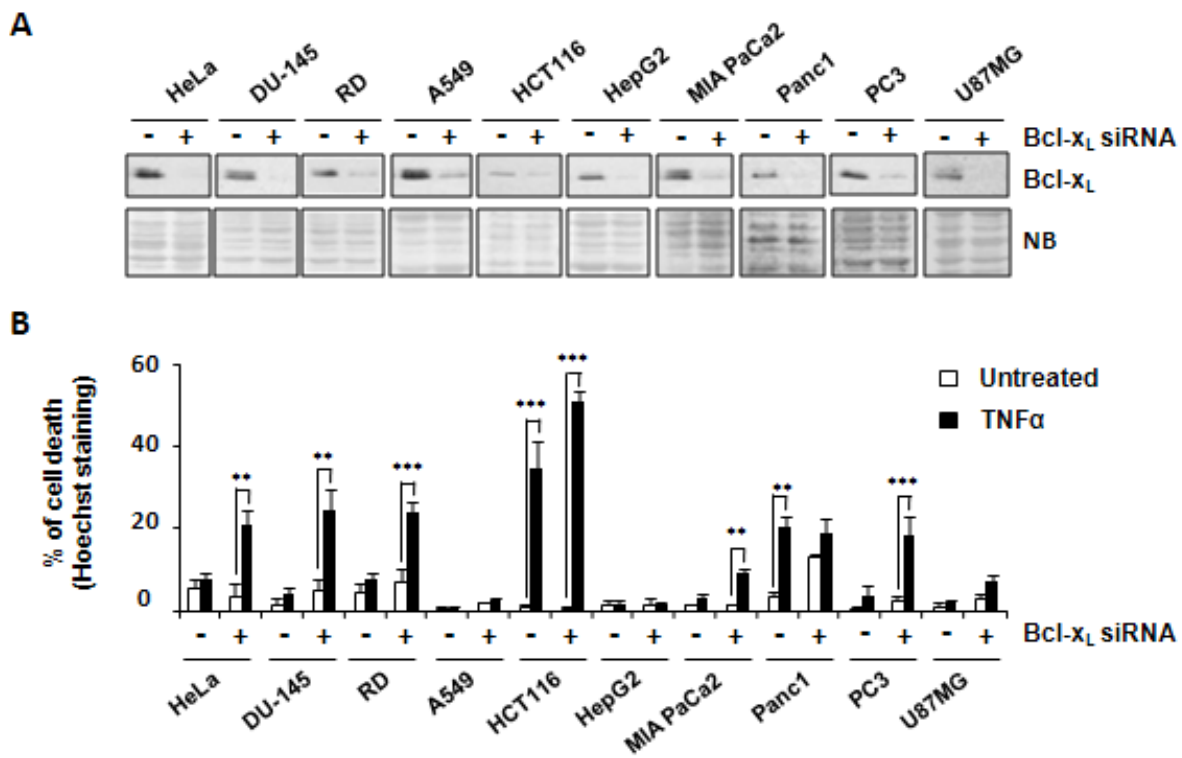


Els resultats mostrats al capítol I d'aquesta tesi, demostren que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> causa la sensibilització a la mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$  i que això es compleix, no només en cèl·lules HeLa, sinó també en cèl·lules RD i DU-145. Seguidament, ens vam plantejar estendre els resultats obtinguts a un panell de línies més extens, provinents de diferents tipus de càncers humans. Com es mostra a la Figura R9, a més a més de les línies cel·lulars prèviament analitzades (HeLa, DU-145 i RD), es van escollir cèl·lules d'adenocarcinoma epitelial alveolar (A549), de carcinoma colorrectal (HCT116), de carcinoma hepatocel·lular (HepG2), d'adenocarcinoma de pàncrees (MIA Paca-2), d'adenocarcinoma de pròstata (PC3) i, per últim, cèl·lules derivades de glioblastoma multiforme (GBM) (U87MG).



**Figura R9.** Patró d'expressió dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en un panell de línies cel·lulars provinents de diferents tipus de càncers humans. Es van obtenir llisats de proteïna totals de les cèl·lules HeLa, DU-145, RD, A549, HCT116, HepG2, MIA Paca-2, Panc1, PC3 i U87MG i es van analitzar per *Western blot* amb els anticossos anti-Bcl-x<sub>L</sub>, anti-Bcl-2, anti-Mcl-1 i anti-Bcl-w. La membrana es va tenyir amb naphthol blue (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes.

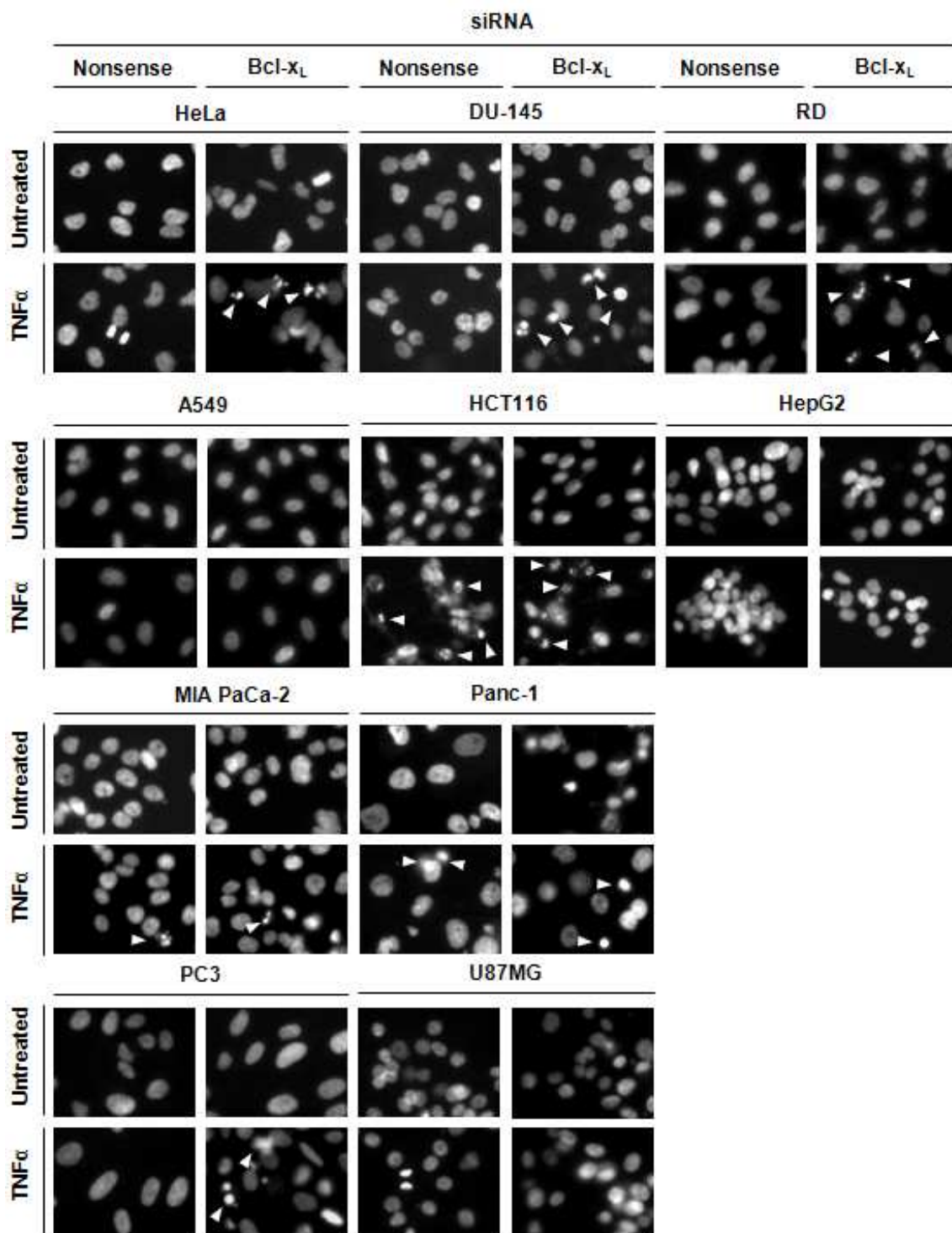
En analitzar els nivells d'expressió dels diferents membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en aquestes cèl·lules, es va veure que existeixen diferències en el patró d'expressió d'aquestes proteïnes (Figura R9). Totes les línies cel·lulars analitzades expressaven Bcl-x<sub>L</sub> en major o menor grau. En canvi, Bcl-2 no s'expressava en les cèl·lules DU-145, A549, HCT116, HepG2, Panc1 i PC3. Bcl-w no s'expressava en les cèl·lules DU-145 i, per últim, Mcl-1 no s'expressava en les cèl·lules A549 i HCT116 (Figura R9).



**Figura R10. Anàlisi de la resposta a la mort induïda per TNF $\alpha$  en diferents línies cel·lulars tumorals on l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> ha estat silenciada.** Les cèl·lules HeLa, DU-145, RD, A549, HCT116, HepG2, MIA Paca-2, Panc1, PC3 i U87MG van ser transfectades amb un siRNA sense sentit (-) o amb un siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> (+) durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna i els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> van ser analitzats per *Western blot* en cadascuna de les línies cel·lulars. Les membranes es van tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular es va obtenir comptant els nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals després de la tinció nuclear amb Hoechst. \*\* P<0.005, \*\*\* P<0.001

En primer lloc, vam voler estudiar si les diferents línies cel·lulars eren resistents o no a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$ . Com es pot observar a la Figura R10B, les cèl·lules HCT-116 i les cèl·lules Panc1 van ser sensibles a la mort cel·lular induïda per la citoquina de forma basal; mentre que la resta de línies cel·lulars van resultar resistents. Seguidament, vam analitzar si les línies cel·lulars que eren resistents a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$  podien esdevenir sensibles mitjançant el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>. Així, vam observar que les cèl·lules MIA Paca-2 i PC3 eren sensibilitzades a la mort induïda per TNF $\alpha$  quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es trobava silenciada; mentre que les cèl·lules A549, HepG2 i U87MG van mostrar una clara resistència a la mort induïda per la citoquina (Figura R10B i R11).





**Figura R11.** Anàlisi de la resposta a la mort induïda per TNF $\alpha$  en diferents línies cel·lulars tumorals on l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> ha estat silenciada. Imatges representatives corresponents a les mostres de la Figura R10.1A que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir les cèl·lules amb Hoechst (fletxes). \*\*\* P<0.001

En conjunt, aquests resultats indiquen que existeixen diversos patrons de resposta a l'acció apoptòtica exercida per TNF $\alpha$ . Dels resultats anteriors, el que més ens va interessar va ser la resistència que presentaven algunes línies cel·lulars a la mort induïda per TNF $\alpha$ , i més especialment quan els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es trobaven disminuïts. A partir d'aquí, vam centrar la nostra atenció en el model de glioblastoma multiforme (U87MG) principalment per dos motius. En primer lloc, de les tres línies resistents a la mort induïda per TNF $\alpha$ , les U87MG eren les úniques cèl·lules que expressaven els quatre membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2. En segon lloc, i tal i com s'ha explicat a la introducció en l'apartat "GBM (Glioblastoma Multiforme) com a model tumoral de rellevància", el GBM és el tumor més comú del sistema nerviós central (Adamson, Kanu *et al.* 2009), classificat com a grau IV degut a la seves característiques d'elevada agressivitat i capacitat infiltrativa, que fan que actualment encara no existeixi cap teràpia per tractar-lo de forma eficaç.

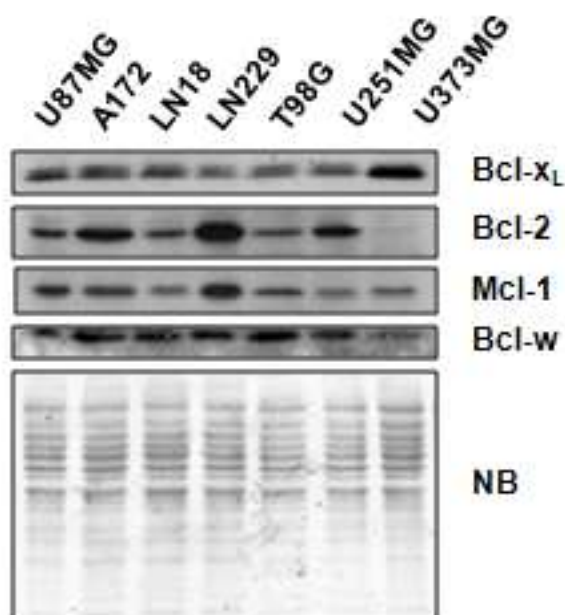
## Capítol 3

Estudi del glioblastoma multiforme  
com a model tumoral que presenta  
resistència a l'activació de la via  
extrínseca



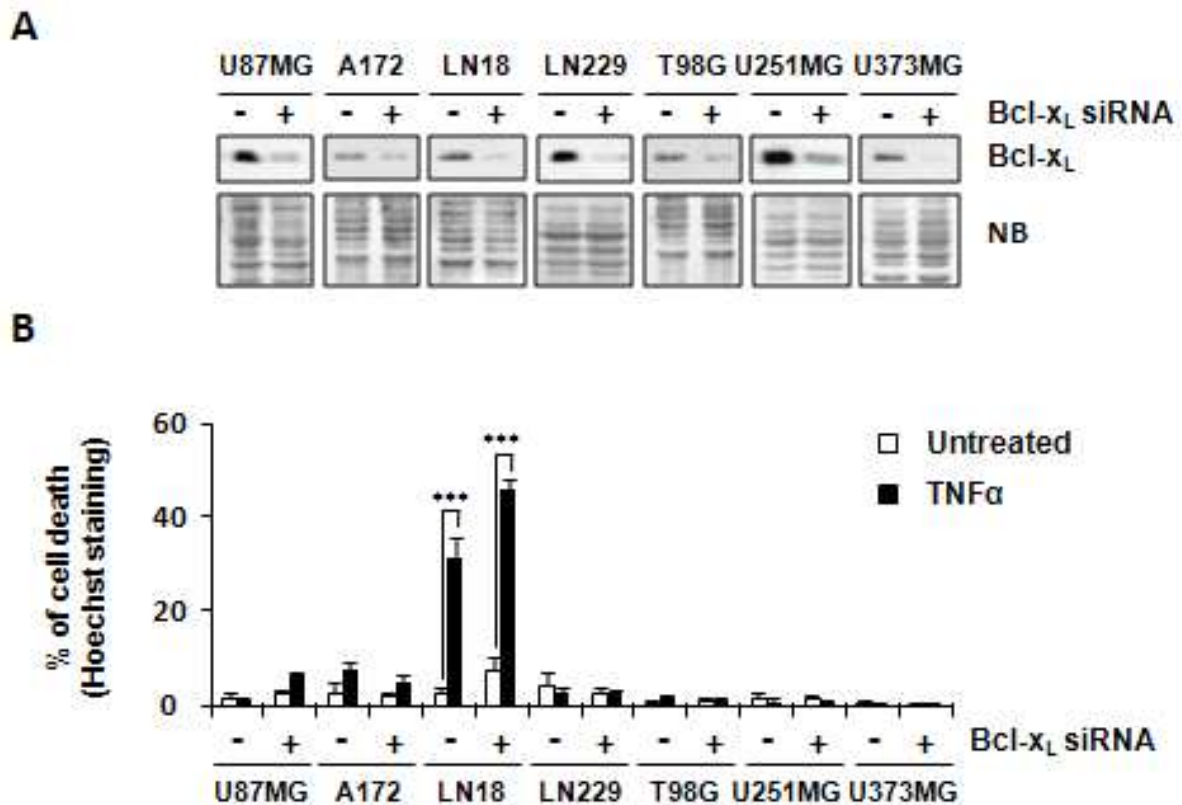
### 3.1. Les línies cel·lulars derivades de GBM humà mostren una resistència generalitzada en resposta a l'estímul de TNF $\alpha$ , inclòs quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es troba regulada a la baixa

Un cop ens vam focalitzar en el GBM com a model d'estudi, vam voler analitzar un panell de línies cel·lulars per poder avaluar si expressaven els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 de forma diferencial i si existien respostes diferents a la mort induïda per TNF $\alpha$ . Com es pot observar a la Figura R12, totes les línies cel·lulars analitzades expressaven les quatre proteïnes anti-apoptòtiques, exceptuant la línia U373MG, que presentava nivells indetectables de Bcl-2.

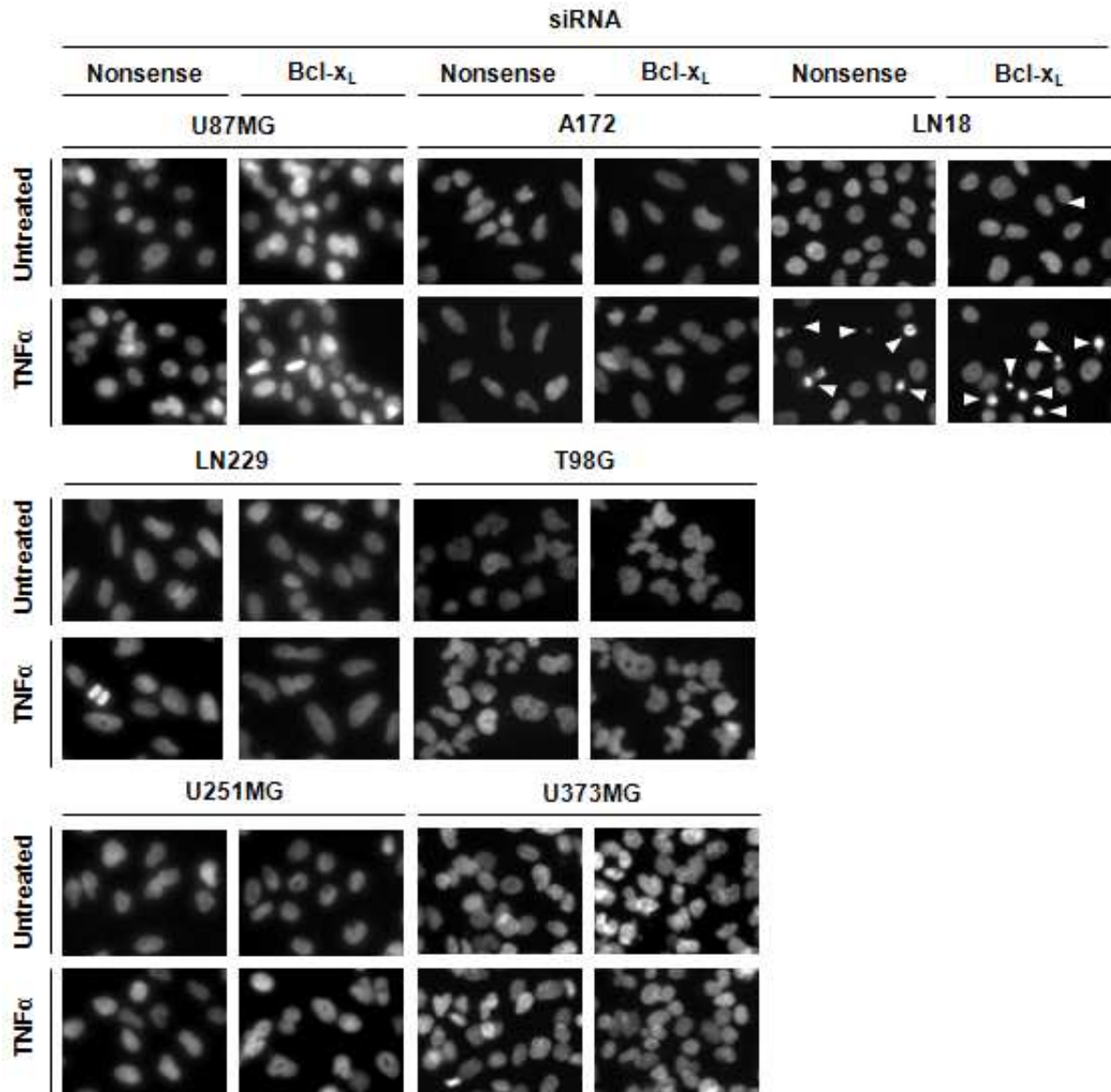


**Figura R12.** Patró d'expressió dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en un panell de línies de GBM. Es van obtenir llisats de proteïna totals de les cèl·lules U87MG, A172, LN18, LN229, T98G, U251MG i U373MG i es van analitzar per Western blot amb els anticossos anti-Bcl-x<sub>L</sub>, anti-Bcl-2, anti-Mcl-1 i anti-Bcl-w. La membrana es va tenyir amb naphthol blue (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes.

Seguidament, es va procedir a analitzar la resposta que presentaven aquestes cèl·lules en front a la citotoxicitat induïda per TNF $\alpha$  després del silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>. Es va observar que Bcl-x<sub>L</sub> va ser silenciada de forma eficaç en totes les línies cel·lulars (Figura R13A). En tractar aquestes cèl·lules amb TNF $\alpha$  (Figura R13B), es va poder observar un comportament generalitzat de resistència a l'apoptosi induïda per la citoquina, encara que l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> estava silenciada. Les úniques cèl·lules que es van comportar de forma diferencial a la resta van ser les LN18, que van resultar ser sensibles de base a la mort induïda per la citoquina, independentment de si Bcl-x<sub>L</sub> es trobava o no silenciada (Figura R13B i R14).



**Figura R13. Anàlisi de la resposta a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  en diverses línies cel·lulars de GBM humà després del silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>.** Les cèl·lules U87MG, A172, LN18, LN229, T98G, U251MG i U373MG van ser transfectades amb un siRNA sense sentit (-) o amb Bcl-x<sub>L</sub> siRNA (+) durant 3 dies. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna i els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> van ser analitzats per *Western blot*. Les membranes es van tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$  durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular es va obtenir comptant els nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals després de la tinció nuclear amb Hoechst 33258. \*\*\* P<0.001

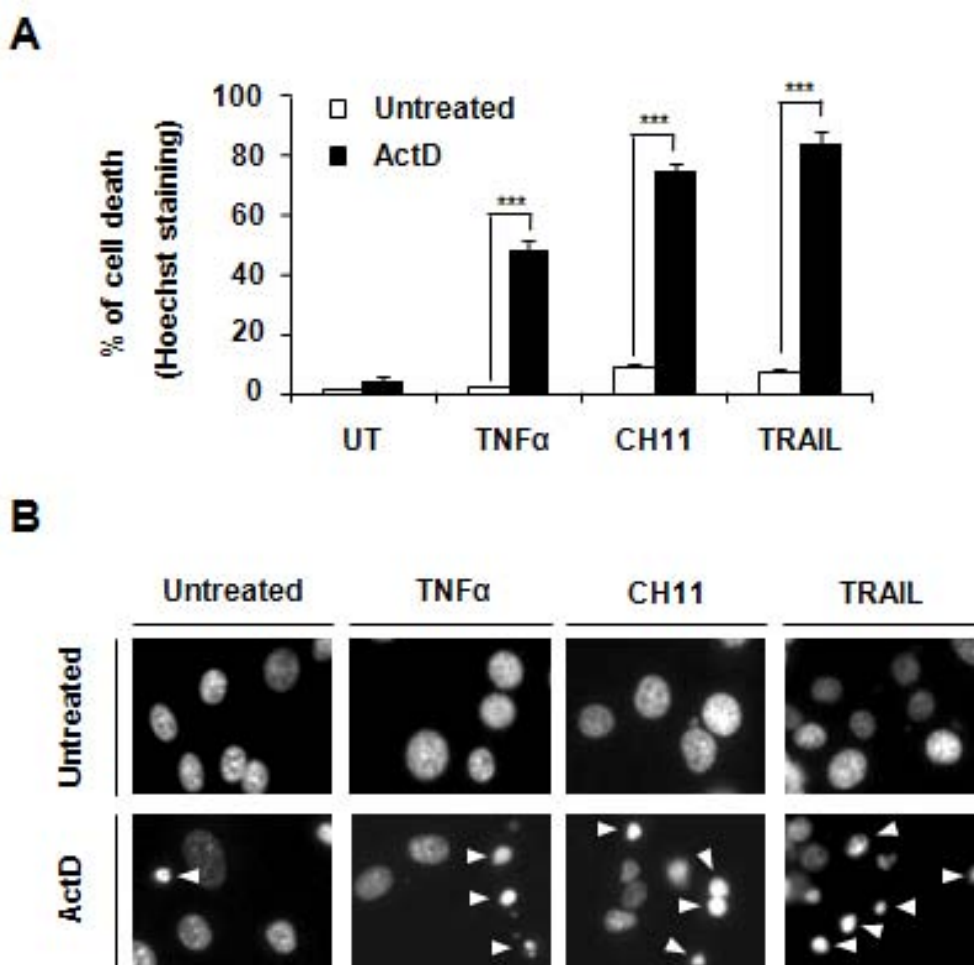


**Figura R14.** Anàlisi de la resposta a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  en diverses línies cel·lulars de GBM humà quan Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada. Imatges representatives corresponents a les mostres de la Figura R13B que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de la tinció nuclear amb Hoechst (fletxes). \*\*\* P<0.001

### 3.2. Les cèl·lules U87MG són resistents a la mort induïda per via extrínseca

Anteriorment havíem observat que les cèl·lules HeLa també resultaven sensibles tant a TNF $\alpha$  com a FasL (mitjançant l'ús de l'anticòs agonista CH11) o TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> estava silenciada (Figura Annexa 1). Per això, un cop comprovat que la resistència a TNF $\alpha$  es tractava d'un fenomen generalitzat en les línies cel·lulars de GBM emprades, ens vam proposar estudiar si aquest fet estava restringit a TNF $\alpha$  o també era així en el

cas dels altres inductors dels “receptors de mort”, CH11 i TRAIL. De les línies cel·lulars de GBM analitzades, vam triar-ne una de representativa. Les cèl·lules LN18 i U373MG van ser descartades perquè les primeres eren sensibles de base a TNF $\alpha$  i les segones no expressaven Bcl-2. Finalment, vam escollir les U87MG ja que, ens les últimes quatre dècades, han estat el model cel·lular més àmpliament utilitzat en l'estudi del GBM (Clark, Homer *et al.* 2010) i cal destacar tant la seva capacitat per formar neuroesferes com la de mimetitzar el comportament d'un GBM *in vivo* (Gunther, Pawlak *et al.* 2003, Ruggieri, Mangino *et al.* 2012, Aaberg-Jessen, Norregaard *et al.* 2013).



**Figura R15. L'actinomicina D sensibilitza les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL.** Les cèl·lules U87MG van ser tractades amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$ , 50 ng/mL de CH11 (un anticòs agonista de FasL) o 50 ng/mL de TRAIL, amb o sense 40nM d'actinomicina D (ActD, un inhibidor de la síntesi macromolecular). (A) El percentatge de mort cel·lular es va obtenir comptant els nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals després de la tinció dels mateixos amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tindre els nuclis amb Hoechst (fletxes). \*\*\* P<0.001

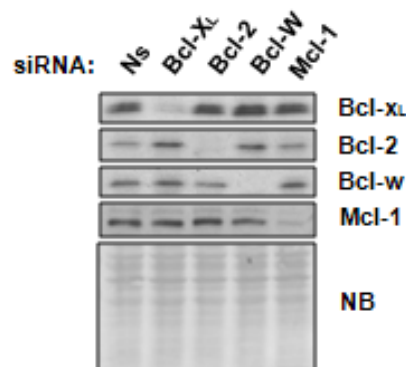


Tal i com s'observa a la Figura R15, les cèl·lules U87MG són resistents a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL. Per tal de descartar si la resistència mostrada per aquestes cèl·lules no era deguda a un defecte intrínsec en la transmissió del senyal, vam co-tractar-les amb un inhibidor de la síntesi macromolecular, com l'actinomicina D (ActD), ja que ha estat reportat que és capaç de sensibilitzar diferents poblacions cel·lulars, en un inici resistents, a la mort apoptòtica mitjançada per l'activació dels "receptors de mort" (Gozzelino, Sole *et al.* 2008). L'addició de l'ActD al medi de cultiu ens va permetre observar que aquestes cèl·lules podien ser sensibilitzades a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL (Figura R15A). Com es mostra a la Figura R15B, les cèl·lules U87MG no exhibeixen la morfologia apoptòtica clàssica, sinó que presenten condensació de la cromatina. Cal esmentar que, segons dades del nostre laboratori però que no formen part d'aquesta tesi, la compactació de la cromatina en resposta a un estímul de mort (tant de via extrínseca com intrínseca) sense fragmentació del nucli, és una característica comuna de totes les línies de GBM.

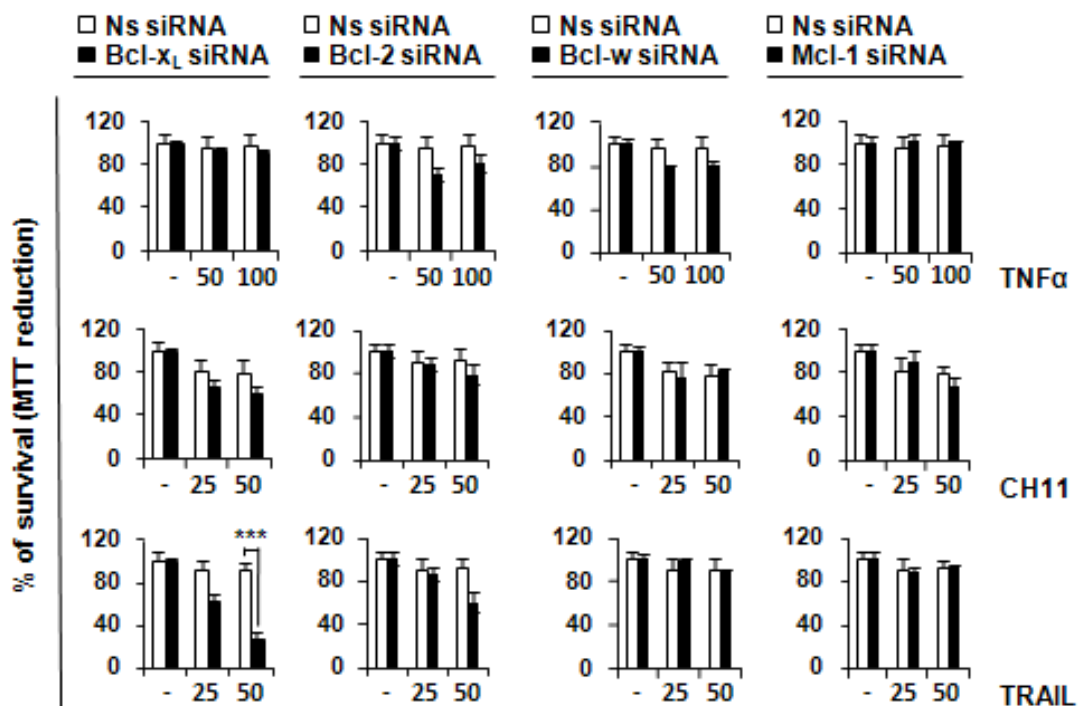
### **3.3. Les cèl·lules U87MG poden ser sensibilitzades a la mort induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub>, però no Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, es troba silenciada de forma específica**

Un cop establert que les cèl·lules podien desencadenar l'apoptosi per via extrínseca, vam voler estudiar si el silenciament individual de cadascun dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 podria sensibilitzar-les a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL (Figura R16A). En tractar les cèl·lules amb diferents concentracions de TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL i analitzar els nivells de supervivència mitjançant l'assaig de reducció d'MTT, vam poder observar que únicament el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, era capaç de sensibilitzar les cèl·lules U87MG a l'acció citotòxica de TRAIL, però no a la de TNF $\alpha$  o CH11 (Figura R16B).

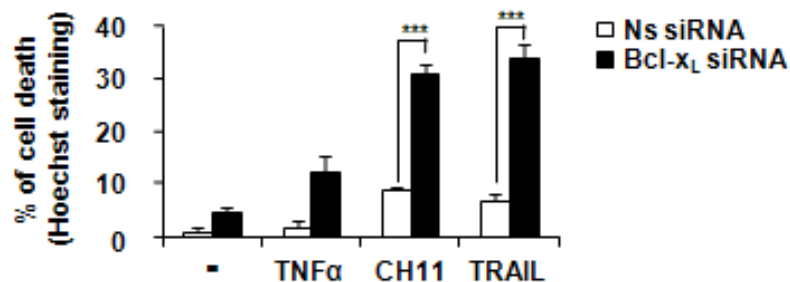
**A**



**B**

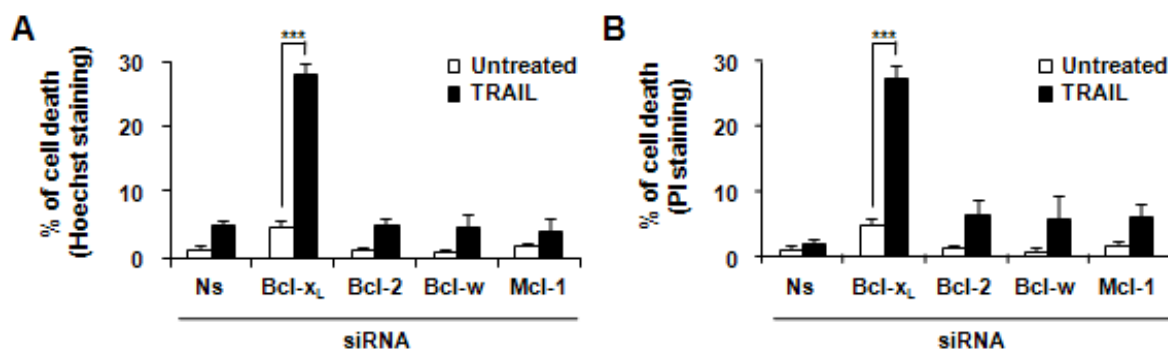


**C**



**Figura R16. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, és capaç de sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL de forma dependent de la mitocòndria i a CH11 de forma independent de la mitocòndria.** (A-B) Les cèl·lules U87MG van ser transfectades amb una siRNA sense sentit (Ns) o amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w durant 3 dies. (A) Els llisats totals de proteïna van ser obtinguts de cèl·lules transfectades amb els diferents siRNAs. Els nivells de proteïna de Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bcl-w i Mcl-1, van ser analitzats per *Western blot*, confirmant així els silenciaments específics. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar (-) o van ser tractades amb 50 o 100 ng/mL de TNF $\alpha$ , 25 o 50 ng/mL de CH11 o 25 o 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. El percentatge de supervivència cel·lular va ser obtingut amb l'assaig de viabilitat cel·lular de reducció d'MTT. (C) Les cèl·lules U87MG van ser transfectades amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> o un siRNA sense sentit (Ns) durant 3 dies. Les cèl·lules van ser deixades sense tractar o tractades amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$ , 50 ng/mL de CH11 o 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. \*\*\* P<0.001

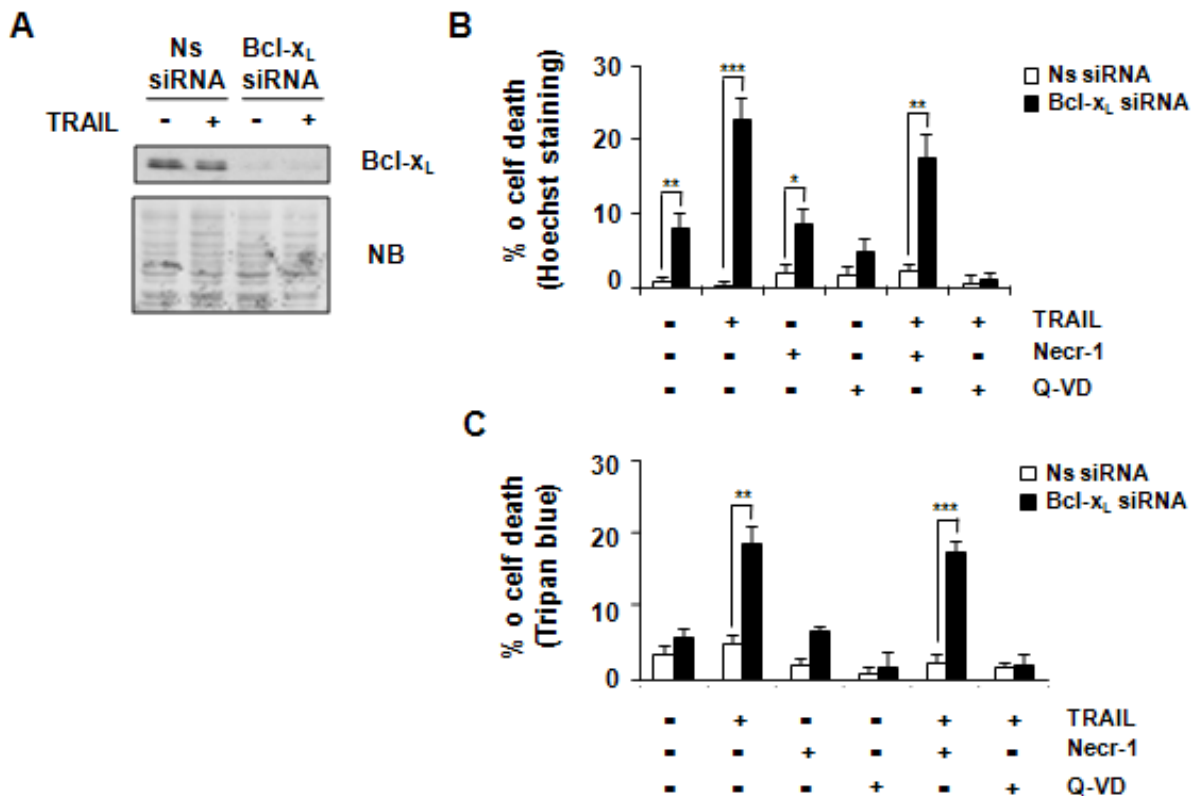
En canvi, mitjançant el recompte de nuclis apoptòtics tenyits amb Hoechst (Figura R16C), vam observar que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> causava la sensibilització tant a la mort induïda tant per TRAIL com per CH11, fet que es discutirà més endavant. Finalment, per corroborar que únicament el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, i no el dels altres membres antiapoptòtics, sensibilitzava les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL, vam silenciar l'expressió de cadascun d'ells (Figura R17). En fer-ho, vam observar que un 28,08 % de cèl·lules transfectades amb el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub> i tractades amb TRAIL, van mostrar morfologies nuclears apoptòtiques i, en canvi, això no va ser així quan es van silenciar els altres membres anti-apoptòtics. (Figura R17A). A més a més, aquest resultat va correlacionar amb que només en el cas del silenciament de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>, un 27,23 % de cèl·lules van ser permeables a la tinció amb Iodur de propidi després del tractament amb TRAIL (Figura R17B).



**Figura R17** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, és capaç de sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL. Les cèl·lules U87MG van ser transfectades amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-w o durant 3 dies. (A-B) Les cèl·lules van ser deixades sense tractar o tractades amb 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. El percentatge de mort va ser obtingut comptant els nuclis apoptòtics respecte els nuclis totals després de la tinció nuclear amb Hoechst 33258 (A) o bé a través del recompte de cèl·lules marcades amb iodur de propidi (PI) (B). Els llisats totals de proteïna són els mateixos que els de la Figura R16A. \*\*\* P<0.001

### 3.4. La mort cel·lular induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada és dependent de caspases

Una vegada corroborat que la regulació a la baixa de Bcl-x<sub>L</sub> era capaç de sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL, vam voler estudiar els mecanismes pels quals aquestes cèl·lules estaven morint. En primer lloc, es van disminuir els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura R18A). A més, es va observar que el tractament amb TRAIL no alterava l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> en les cèl·lules transfectades amb el siRNA sense sentit (Figura R18A). En tractar les cèl·lules que tenien Bcl-x<sub>L</sub> silenciada amb TRAIL, vam poder observar que, només el tractament amb q-VD-OPh, però no amb necrostatina-1, va prevenir la mort cel·lular, indicant que s'havia d'estar activant un procés de mort cel·lular dependent de caspases (Figura R18B i R18C). Aquests resultats van ser analitzats mitjançant el recompte del percentatge de nuclis apoptòtics tenyits amb Hoechst (Figura R18B) i comptant les cèl·lules permeables al colorant blau de tripà (Figura R18C).

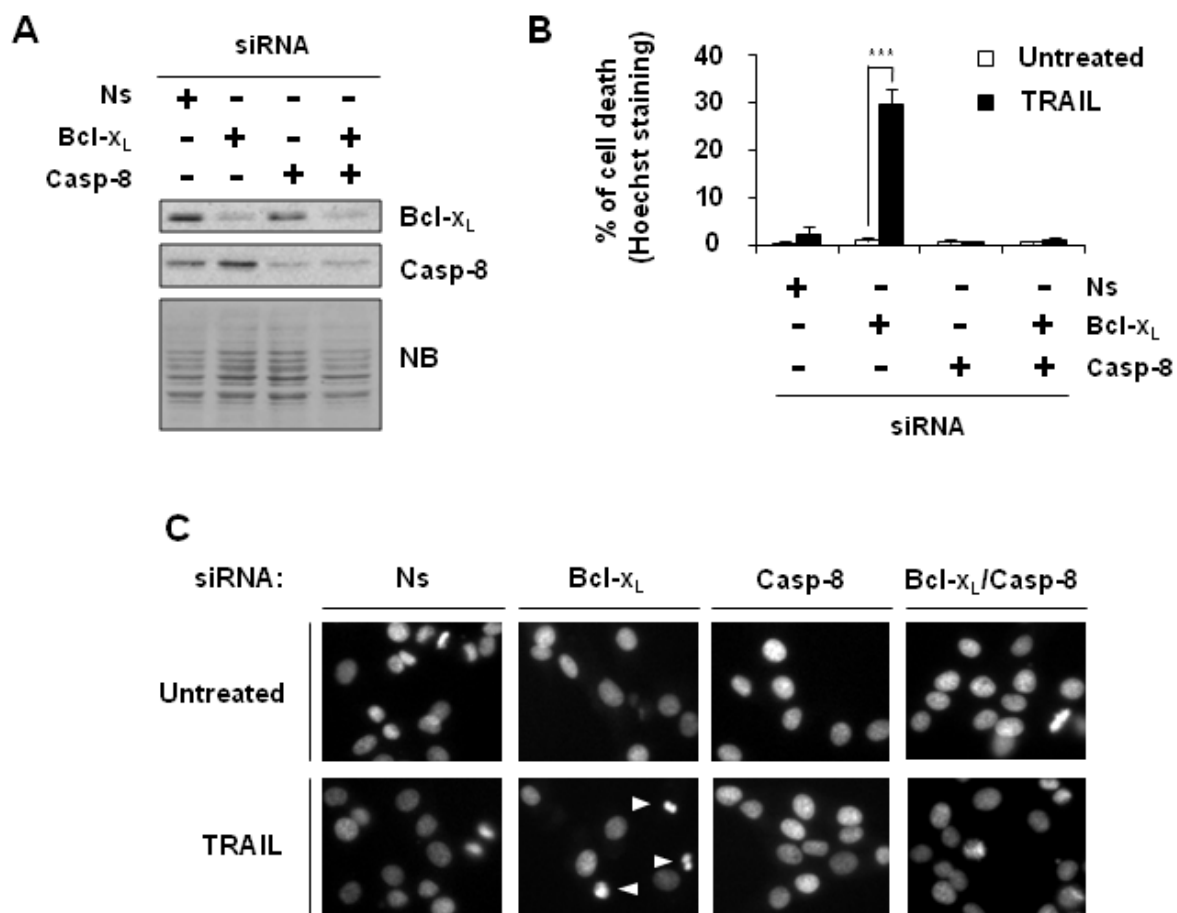


**Figura R18. La mort cel·lular induïda per TRAIL en cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciada és dependent de caspases.** Les cèl·lules U87MG van ser transfectades amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> o amb un siRNA sense sentit (Ns) durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules transfectades amb els siRNAs i que havien estat tractades amb 50 ng/mL de TRAIL (+) o no tractades (-). Els llisats van ser analitzats per *Western blot* utilitzant l'anticòs anti-Bcl-x<sub>L</sub> per comprovar la correcta disminució de la proteïna. La membrana es va tenyir amb *naphtol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B-C) Les cèl·lules transfectades amb Ns siRNA (barres blanques) o amb Bcl-x<sub>L</sub> siRNA (barres negres), van ser tractades amb 50 ng/mL de TRAIL i / o 10 μM de necrostatina-1 (Nec-1) o 20 μM de q-VD-OPh (QVD) durant 24 h (+) o es van deixar sense tractar (-). El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258 (C) o bé amb el recompte de cèl·lules positives per *Tripin-blue*. \* P<0.01, \*\* P<0.005, \*\*\* P<0.001

### 3.5. La caspasa-8 és requerida com a caspasa iniciadora a l'hora de promoure la mort induïda per TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada

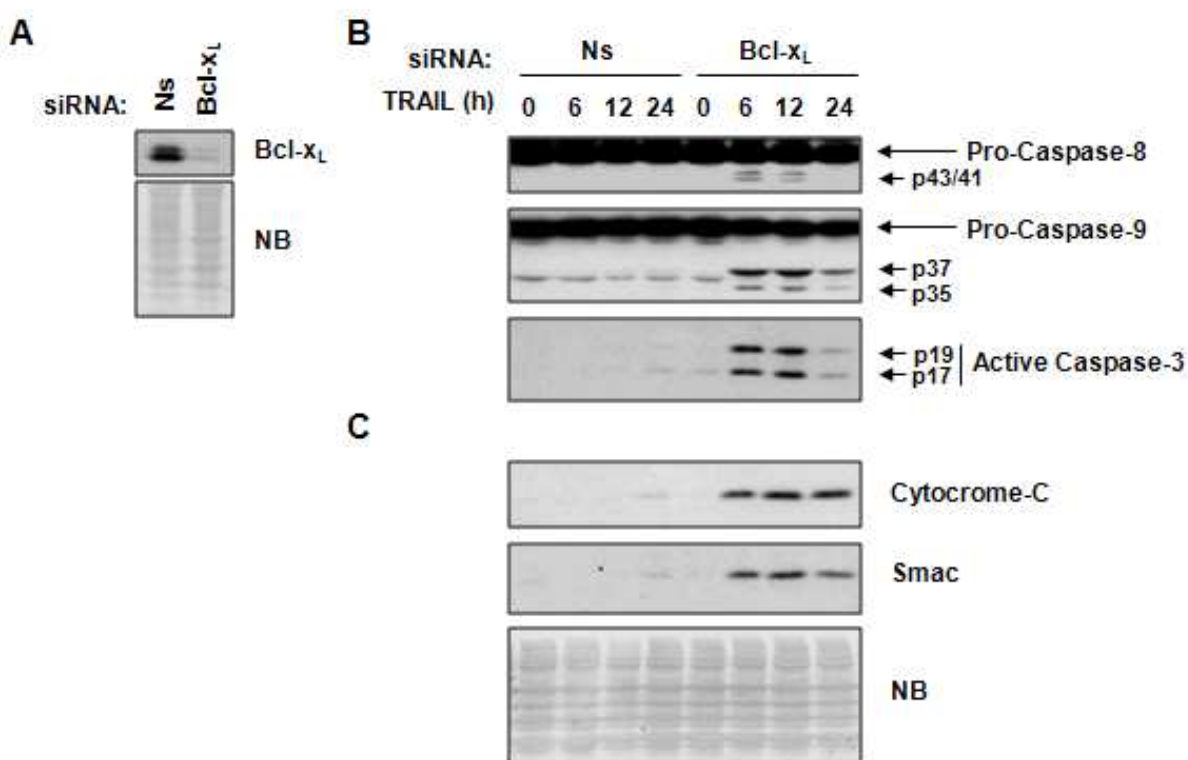
Per tal d'estudiar si la mort induïda per TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> estava silenciada requeria la caspasa-8 com a caspasa iniciadora, vam transfectar les cèl·lules U87MG amb un siRNA sense sentit, el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub>, el siRNA de caspasa-8 o una combinació dels siRNAs de Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8

(Figura R19A). Com es pot veure a la Figura R19B i R19C, el siRNA de caspasa-8 va revertir per complet la mort induïda per TRAIL en cèl·lules que tenien silenciada Bcl-x<sub>L</sub>. Aquests resultats indiquen que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi induïda per TRAIL de forma dependent de caspasa-8.



**Figura R19.** L'apoptosi induïda per TRAIL en cèl·lules que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> requereix la caspasa-8. Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, caspasa-8 o la combinació dels siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna de les cèl·lules transfectades (+) o no (-) amb cadascun dels siRNAs i els nivells de proteïna de Bcl-x<sub>L</sub> i de pro-caspasa-8 es van analitzar per *Western blot*. (B) Les cèl·lules es van tractar (barres negres) o no (barres blanques) amb 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst. \*\*\* P<0.001.

Per tal d'analitzar si altres caspases, a més a més de caspasa-8, també s'estaven activant, es va silenciar l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> en cèl·lules U87MG (Figura R20A) i es va realitzar un curs temporal de tractaments amb TRAIL durant 6, 12 i 24 h (Figura R20B). Així, es van poder observar els processaments de les pro-caspases-8, -9 i -3 en els seus fragments actius a partir de les 6 h, que es van mantenir fins les 24 h (Figura R20B). Això va ser consistent amb la sortida de la mitocòndria d'Smac / DIABLO i de citocrom c, observada en els tres temps analitzats (Figura R20C).

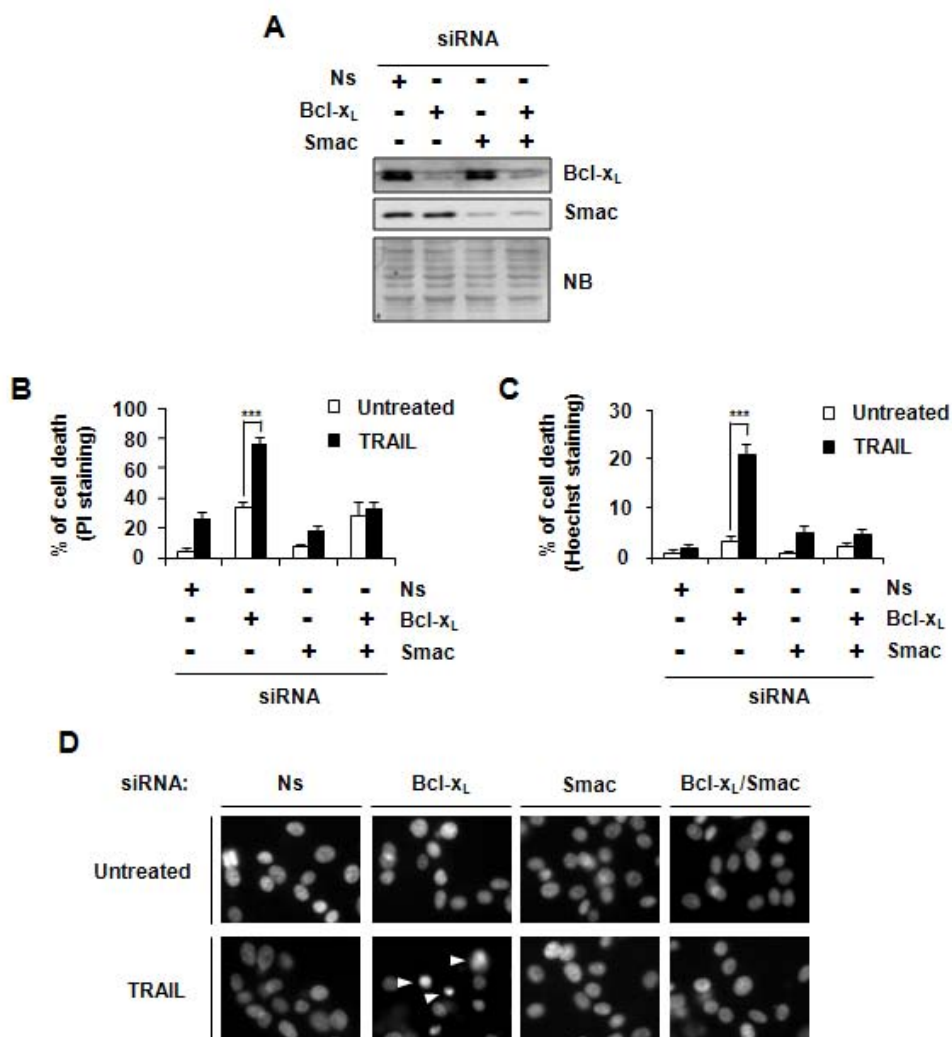


**Figura R20.** L'apoptosi induïda per TRAIL en les cèl·lules U87MG transfectades amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> provoca l'activació de la maquinària apoptòtica. Les cèl·lules U87MG van ser transfectades amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de cèl·lules transfectades amb els siRNAs que van ser analitzats per *Western blot* utilitzant l'anticòs anti-Bcl-x<sub>L</sub> per comprovar la disminució dels nivells de proteïna. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B-C) Les cèl·lules transfectades es van deixar sense tractar (0) o van ser tractades amb 50 ng/mL de TRAIL durant 6, 12 o 24 h i es van obtenir llisats citosòlics. El processament de la pro-caspasa-8, la pro-caspasa-9 i la pro-caspasa-3 en els seus fragments actius (B), així com l'alliberament del citocrom c i d'Smac / DIABLO de la mitocòndria (C), van ser analitzats mitjançant *Western blot*. La membrana es van tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes.

Aquests resultats indiquen que quan els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es troben disminuïts, TRAIL indueix l'apoptosi a través de la via intrínseca, involucrant a la mitocòndria i permetent l'activació de les caspases iniciadores, l'alliberament de citocrom c i d'Smac / DIABLO, l'activació de les caspases executores i, finalment, l'execució del procés apoptòtic.

### 3.6. El silenciament d'Smac / DIABLO és suficient per revertir la mort induïda per TRAIL quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> està regulada a la baixa

Donat que els nostres resultats indicaven que la mort induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> estava silenciada era una mort que implicava l'alliberació dels factors pro-apoptogènics de la mitocòndria, citocrom c i Smac / DIABLO (Figura R20B), vam voler estudiar si la inhibició d'alguna d'aquestes molècules, podria evitar el procés apoptòtic.

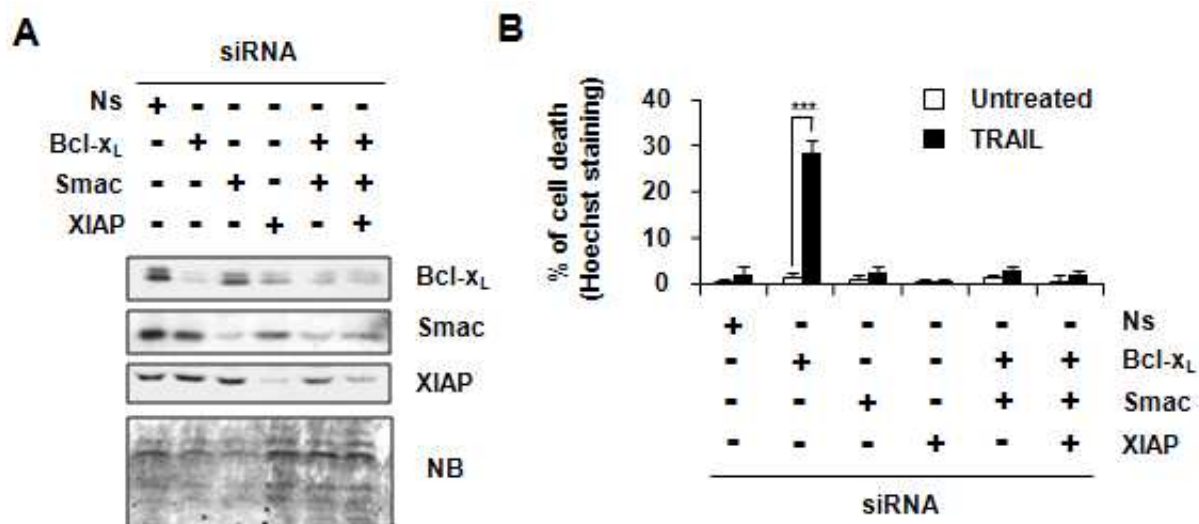




**Figura R21. L'apoptosi induïda per TRAIL en cèl·lules U87MG que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> és rescatada pel silenciament d'Smac / DIABLO.** Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, Smac / DIABLO o la combinació dels siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna de les diferents cèl·lules, transfectades (+) o no (-), amb cadascun dels siRNAs i els nivells de proteïna de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO es van analitzar per *Western blot*. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B-C) Les cèl·lules es van tractar (barres negres) o no (barres blanques) amb 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h i el percentatge de mort cel·lular va ser obtingut comptant les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi respecte les totals (B) o bé comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals tenyits amb Hoechst 33258 (C). (D) Imatges representatives de la morfologia apoptòtica després de la tinció nuclear amb Hoechst (fletxes). \*\*\* P<0.001.

Així doncs, les cèl·lules U87MG es van transfectar amb un siRNA sense sentit, el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub>, el siRNA de Smac / DIABLO o una combinació dels siRNAs de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO (Figura R21A). Com es pot veure a les Figures R21B, R21C i R21D, les cèl·lules en les que es van silenciar tant els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> com els d'Smac / DIABLO, es van tornar de nou resistents a l'acció citotòxica de TRAIL. Aquests resultats suggereixen que quan Bcl-x<sub>L</sub> és funcional, aquest manté Smac / DIABLO dins la mitocòndria i evita que s'alliberi al citosol.

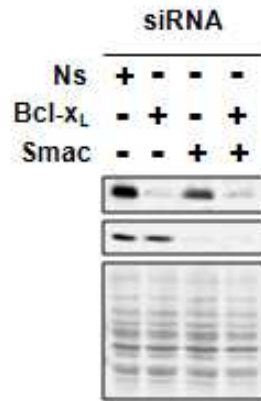
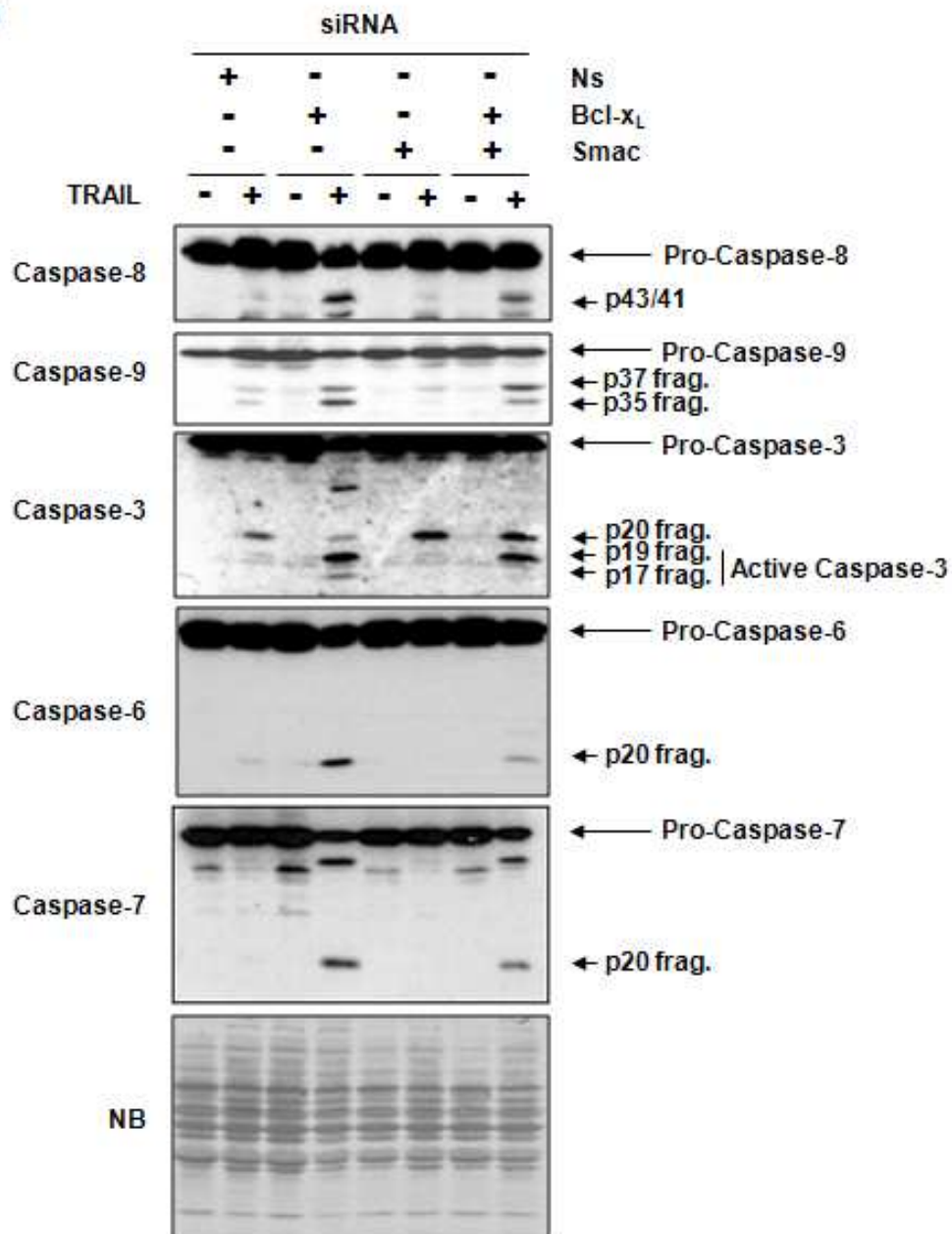
Tal i com s'ha descrit a la Introducció, la funció principal d'Smac / DIABLO és la d'inhibir a les IAPs per tal de permetre l'activació de les caspases i l'execució de l'apoptosi. D'aquestes, XIAP és l'únic membre de la família de les IAPs que es considera un inhibidor veritable de les caspases (Eckelman, Salvesen *et al.* 2006). Per aquest motiu, ens vam preguntar si el silenciament de l'expressió de XIAP podria revertir l'efecte protector promogut pel siRNA d'Smac / DIABLO en cèl·lules que tenien Bcl-x<sub>L</sub> silenciats. Però, tal i com es mostra a la Figura R22, el silenciament de XIAP no va provocar cap efecte en les cèl·lules que tenien alhora silenciades tant l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> com la d'Smac / DIABLO.

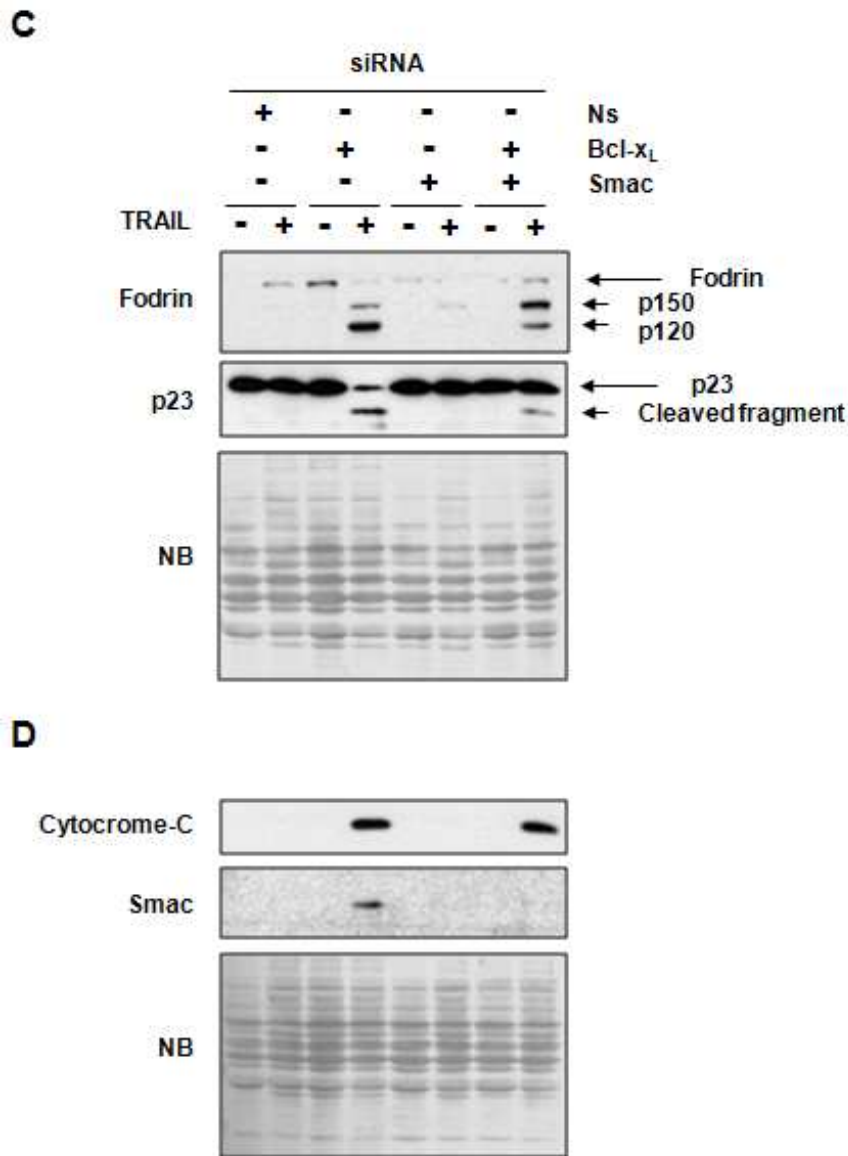


**Figura R22.** El silenciament de XIAP no és suficient per revertir els efectes de protecció causats pel siRNA contra Smac / DIABLO en cèl·lules U87MG que tenen l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> silenciada i han estat estimulades amb TRAIL. Les cèl·lules U87MG van ser transfectades (+) o no (-) amb un siRNA sense sentit (Ns), amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, Smac / DIABLO, XIAP, co-transfectades amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO o co-transfectades amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub>, Smac / DIABLO i XIAP durant 3 dies. (A) Es van obtenir llisats totals de proteïna i els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub>, Smac / DIABLO i XIAP van ser analitzats per *Western blot*. La membrana es va tenyir amb *naphtol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir els nuclis amb Hoechst (fletxes). \*\*\* P<0.001

Com que els nostres resultats indicaven que Bcl-x<sub>L</sub> estava regulant l'alliberament d'Smac / DIABLO, vam voler aprofundir en aquest fet i estudiar quines alteracions bioquímiques es produïen en l'activació del mecanisme apoptòtic en absència tant de Bcl-x<sub>L</sub> com d'Smac / DIABLO. Per fer-ho, les cèl·lules U87MG es van transfectar amb un siRNA sense sentit, el siRNA de Bcl-x<sub>L</sub>, el siRNA de Smac / DIABLO o una combinació dels siRNAs de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO (Figura R23A). El tractament durant 6 h amb TRAIL va promoure el processament de caspasa-8 i caspasa-9 en els seus fragments actius, tant en les cèl·lules que tenien disminuïda l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>, com en les que tenien alhora silenciades l'expressió Bcl-x<sub>L</sub> i d'Smac / DIABLO (Figura R23B). No obstant, es va observar una inversió en el patró de bandes d'activació de

caspassa-9: el fragment que presentava més intensitat quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es trobava silenciada va ser p35, mentre que quan es va silenciar alhora Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO va ser el fragment p37 (Figura R23B). En el cas de caspassa-3, el processament que es va produir quan Bcl-x<sub>L</sub> estava regulat a la baixa va ser diferent al que s'observava quan els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO van ser silenciats alhora. Així, la disminució de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> va promoure la proteòlisi dels dos fragments actius de caspassa-3, p17 i p19. En canvi, el fragment p17 no es va observar quan, a part de Bcl-x<sub>L</sub>, Smac / DIABLO també es trobava silenciats (Figura R23B). Per últim, el fragment actiu de les caspases-6 i -7 es va observar tant després del silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> com del co-silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> i d'Smac / DIABLO. Cal esmentar que TRAIL va ser capaç de produir una activació parcial de caspassa-8 i caspassa-9 en els seus fragments actius, així com una pre-activació de la caspassa-3 en el seu fragment p20 fins i tot en les cèl·lules transfectades amb un siRNA sense sentit (Figura R23B). Els resultats anteriors van ser corroborats amb l'observació de l'aparició dels fragments proteolítics d'alguns dels substrats de les caspases (Figura 21C). Així, quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es trobava silenciada, TRAIL va induir el processament de la Fodrina en el seu fragment p120, proteolitzat específicament per caspassa-3 (Janicke, Ng *et al.* 1998).

**A****B**



**Figura R23.** El silenciament d'Smac / DIABLO rescata la mort induïda per TRAIL en cèl·lules que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>, malgrat que el citocrom c es troba alliberat al citosol i les caspases es troben activades. Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> o Smac / DIABLO o co-transfectades amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna de les cèl·lules transfectades (+) o no (-) amb cadascun dels siRNAs i els nivells de proteïna de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO es van analitzar per *Western blot*. (B-D) Les cèl·lules es van tractar (+) o no (-) amb 50 ng/mL de TRAIL durant 6 h i es van obtenir extractes citosòlics. Els processaments de les pro-caspases-8, -9, -3, -6 i -7 en els seus fragments actius (B), així com els processaments de Fodrina i p23 produïts per caspases (C), i l'alliberament del citocrom c i Smac / DIABLO de la mitocòndria (D), es van analitzar mitjançant *Western blot*. (B-D) Les membranes es van tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes.

En canvi, en silenciar Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO alhora, l'aparició del fragment p120 es va veure reduïda, podent-se observar la Fodrina en la seva forma sense processar, de 240 kDa. De la mateixa manera, quan només es van disminuir els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es va observar la proteòlisi de la co-xaperona p23 en el seu fragment actiu produït específicament per caspasa-7 (Janicke, Ng *et al.* 1998). En canvi, quan es van silenciar alhora Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, es va observar que el processament de p23 es trobava significativament reduït, tant per la disminució en la intensitat del fragment proteolitzat per caspasa-7, com per la recuperació dels nivells p23 (Figura R23C). D'altra banda, també es van observar nivells comparables de citocrom c en el citosol quan es va silenciar l'expressió Bcl-x<sub>L</sub> i quan es van silenciar alhora Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, fet que es correlaciona amb l'activació de caspases observada en les dues condicions (Figura 21D).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que, tot i que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> i el tractament amb TRAIL provoca que el citocrom c pugui ser alliberat de la mitocòndria cap al citosol independentment que Smac / DIABLO estigui o no silenciada, el grau d'activació de les caspases no seria suficient per sensibilitzar les cèl·lules a l'apoptosi induïda per la citoquina.

## Capítol 4

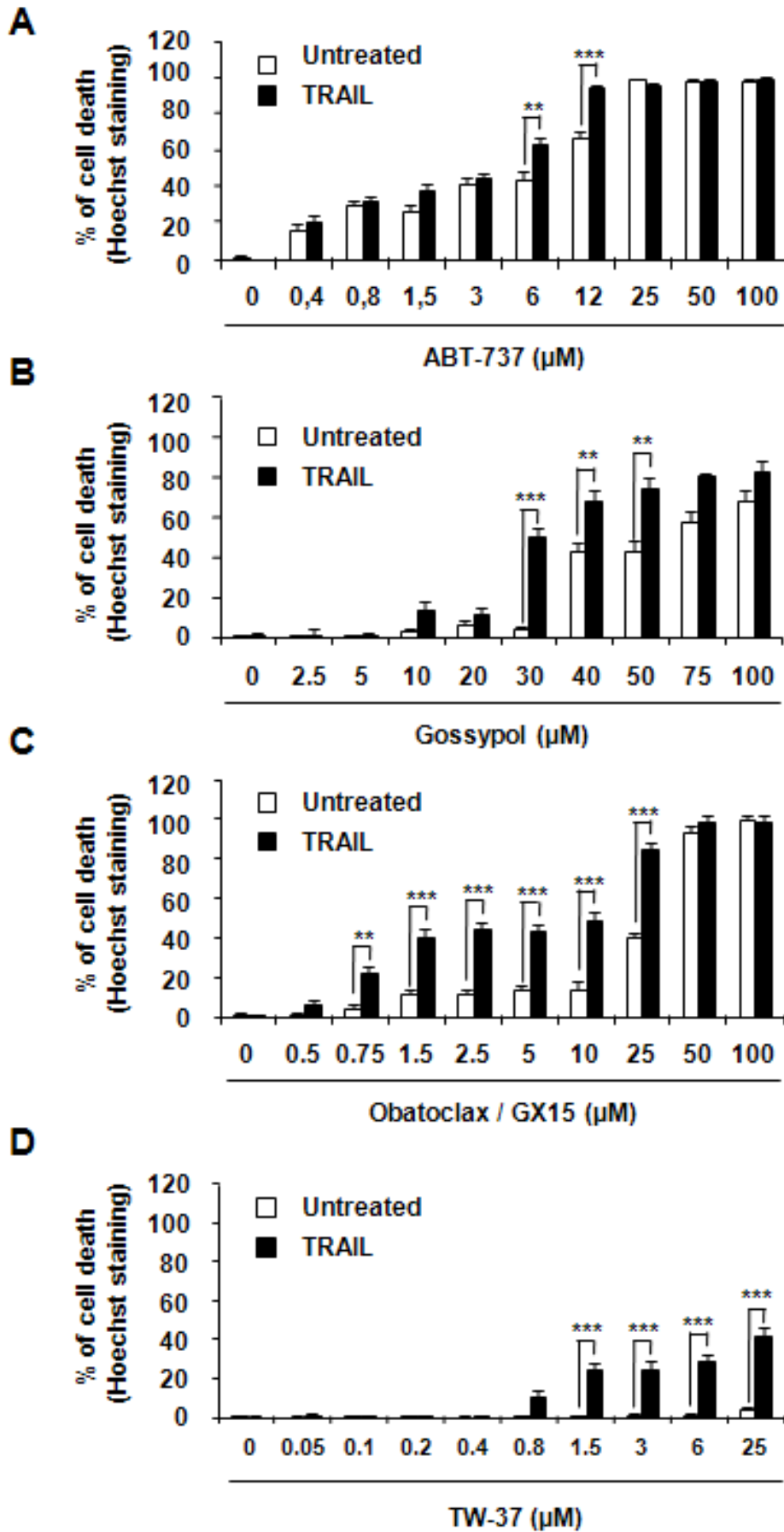
Caracterització de l'efecte citotòxic dels BH3-mimètics i del seu potencial sensibilitzador a la mort cel·lular induïda per TRAIL en cèl·lules U87MG





El conjunt de resultats del capítol III d'aquesta tesi, ens va indicar que, en les cèl·lules U87MG, el silenciament específic de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitzava de forma específica a la mort induïda per via extrínseca a través del receptor de TRAIL. La metodologia en la qual es van basar els nostres experiments va ser el silenciament dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 per mitjà de la transfecció de siRNAs específics. Cal tenir en compte, però, les limitacions terapèutiques en l'ús de siRNAs ja que encara no és possible alliberar-los específicament a les cèl·lules tumorals, tot i que s'està investigant en aquest sentit (revisat en (Devi 2006, Seth, Johns *et al.* 2012)). En canvi, existeix una estratègia terapèutica relacionada amb la inhibició dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 per mitjà de l'ús dels *BH3-mimetics* (veure apartat "Les proteïnes de la família de Bcl-2 com a dianes terapèutiques per al tractament de càncer" de la introducció) (Marzo and Naval 2008, Frenzel, Grespi *et al.* 2009). Donat que els nostres resultats indicaven que la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> era una bona estratègia per a sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL, vam voler analitzar si substituint l'ús dels siRNAs pel d'inhibidors capaços de neutralitzar l'acció dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2, era possible aconseguir l'efecte de sensibilització a la mort induïda per TRAIL obtinguda amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>. En el nostre paradigma, la millor aproximació seria la utilització d'un *BH3-mimetic* que neutralitzés específicament a Bcl-x<sub>L</sub>. No obstant, encara no s'ha descrit cap *BH3-mimetic* que inhibeixi només a un membre anti-apoptòtic de la família de Bcl-2.

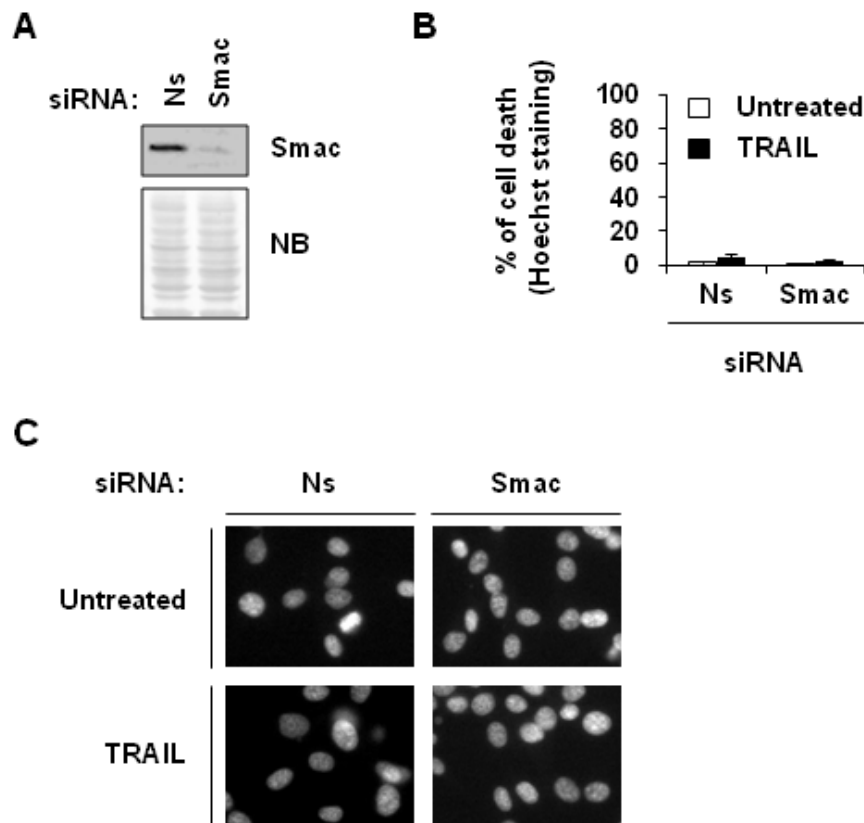
Vam decidir utilitzar diferents *BH3-mimetics*: ABT-737, Gossypol, GX15 / Obatoclox i TW-37, els quals han estat descrits a la introducció. El primer que varem voler avaluar va ser, d'una banda, la resposta citotòxica basal que induïen aquests agents en cèl·lules U87MG i, de l'altra, si els *BH3-mimetics* eren capaços de sensibilitzar-les a la mort induïda per TRAIL. Es van realitzar curves de dosi-resposta per cadascun dels quatre compostos en presència o no de TRAIL (Figura R24) i vam poder observar diferents patrons de resposta per cada compost.



**Figura R24. Els BH3-mimetics poden sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL.** Les cèl·lules es van tractar (barres negres) o no (barres blanques) amb 50 ng/mL de TRAIL juntament amb diferents concentracions de ABT-737 (A), Gossypol (B), GX15 / Obatoclox (C) i TW-37 (D), i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258 (A-D). \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.001

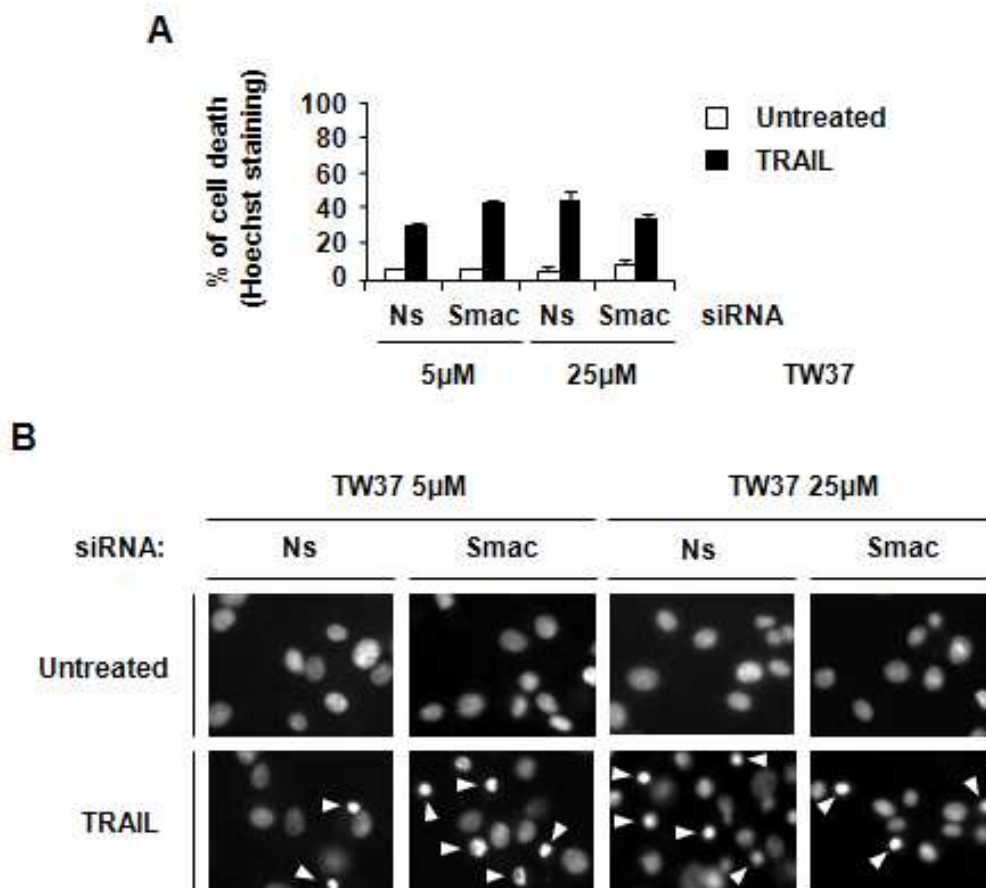
En primer lloc, ABT-737, les dianes del qual són Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w però no Mcl-1 (Oltersdorf, Elmore *et al.* 2005, van Delft, Wei *et al.* 2006), produïa més d'un 20 % de mortalitat per si sol a partir de 0,8 µM i es va observar sensibilització a TRAIL en tractar les cèl·lules amb les concentracions de 6 i 12 µM (Figura R24A). En segon lloc, el Gossypol (Figura R24B), que inhibeix a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1 però no a Bcl-w (Vogler, Dinsdale *et al.* 2009), vam observar que era tòxic per si sol a partir d'una concentració de 40 µM (on produïa aproximadament un 40 % de mort cel·lular) i que les concentracions entre 30 i 50 µM podien sensibilitzar a la mort induïda per TRAIL. En tercer lloc, GX15 / Obatoclox, que és capaç d'inhibir els cinc membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2, però amb una afinitat baixa (Zhai, Jin *et al.* 2006), va ser citotòxic per si sol a partir de 25 µM (produint aproximadament un 35 % de mort) i va ser capaç de sensibilitzar a l'apoptosi induïda per TRAIL a partir de 0,75 µM (Figura R24C). En quart i últim lloc, TW-37, que inhibeix a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1 però no a Bcl-w (Verhaegen, Bauer *et al.* 2006, Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006), varem veure que no induïa mort de forma basal (en la Figura R24B es mostra fins a una concentració de 25 µM però cal dir que al laboratori es va avaluar fins als 100 µM sense obtenir percentatges de mort superiors al 5 %). En canvi, vam detectar que entre 1,5 i 25 µM, TW-37 era capaç de sensibilitzar a l'estímul de TRAIL (Figura R24D). En conjunt, els nostres resultats mostren que tots els inhibidors tenen la capacitat de poder sensibilitzar a l'apoptosi induïda per TRAIL amb més o menys mesura. Amb l'objectiu de caracteritzar el mecanisme pel qual les cèl·lules morien en presència d'aquests inhibidors i, tenint en compte els resultats obtinguts en els experiments anteriors on vam observar que el silenciament d'Smac / DIABLO podia revertir la mort induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> estava silenciada, ens vam interessar en comprovar si Smac / DIABLO també podia estar jugant un paper important en la mort induïda pels *BH3-mimetics*. Per fer-ho, vam escollir dues concentracions de cada *BH3-mimetic* que

sensibilitzessin a la mort induïda per TRAIL. En primer lloc, vam comprovar que el silenciament d'Smac / DIABLO (Figura R25A) no comportava toxicitat ni sensibilitzava a l'apoptosi induïda per TRAIL (Figura R25B-C).



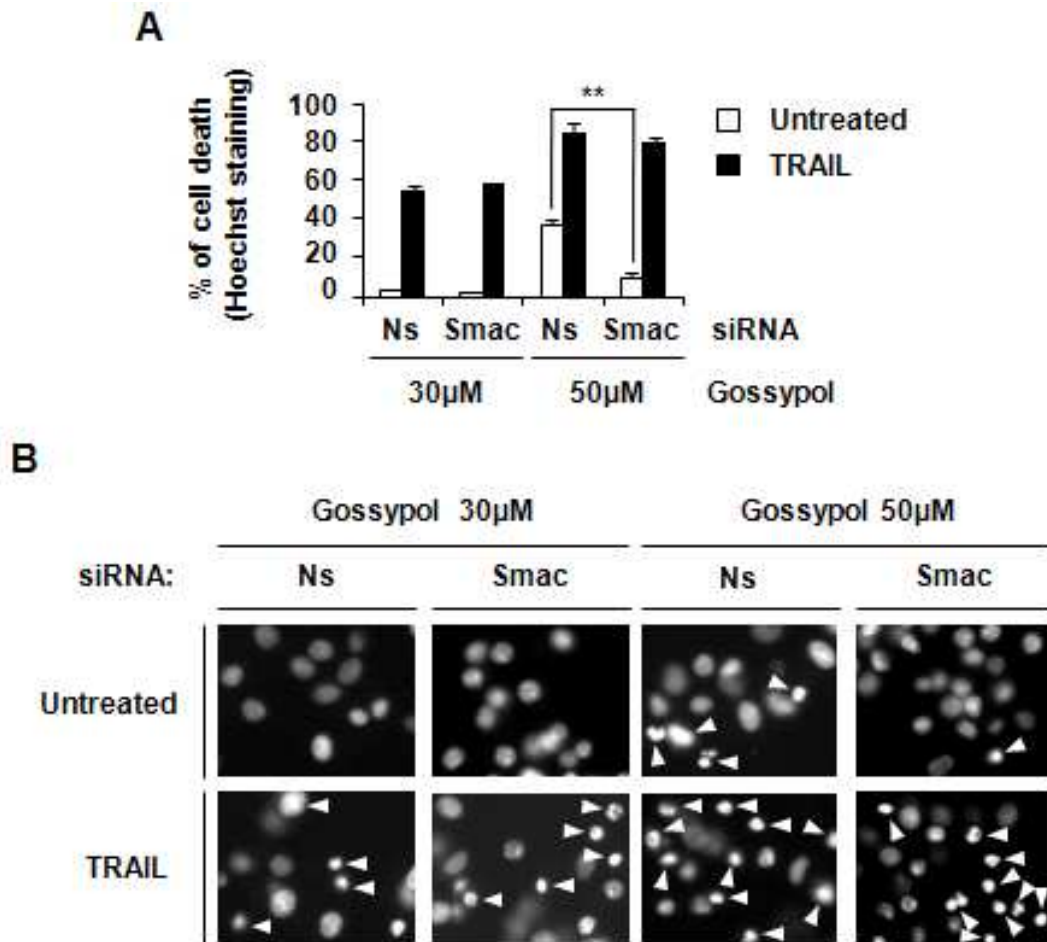
**Figura R25.** El silenciament d'Smac / DIABLO no té efectes sobre la viabilitat de les cèl·lules U87MG quan aquestes són estimulades amb TRAIL. Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Smac / DIABLO. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna de les cèl·lules transfectades amb cadascun dels siRNAs i els nivells de proteïna d'Smac / DIABLO es van analitzar per *Western blot*. (B) Les cèl·lules es van tractar (barres negres) o no (barres blanques) amb 50 ng/mL de TRAIL i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst.

En analitzar l'efecte de la transfecció del siRNA d'Smac / DIABLO en la mort induïda per TW-37 més TRAIL, vam observar que la disminució de l'expressió d'Smac / DIABLO no va ser capaç de revertir l'apoptosi induïda per la combinació d'aquests. (Figura R26).



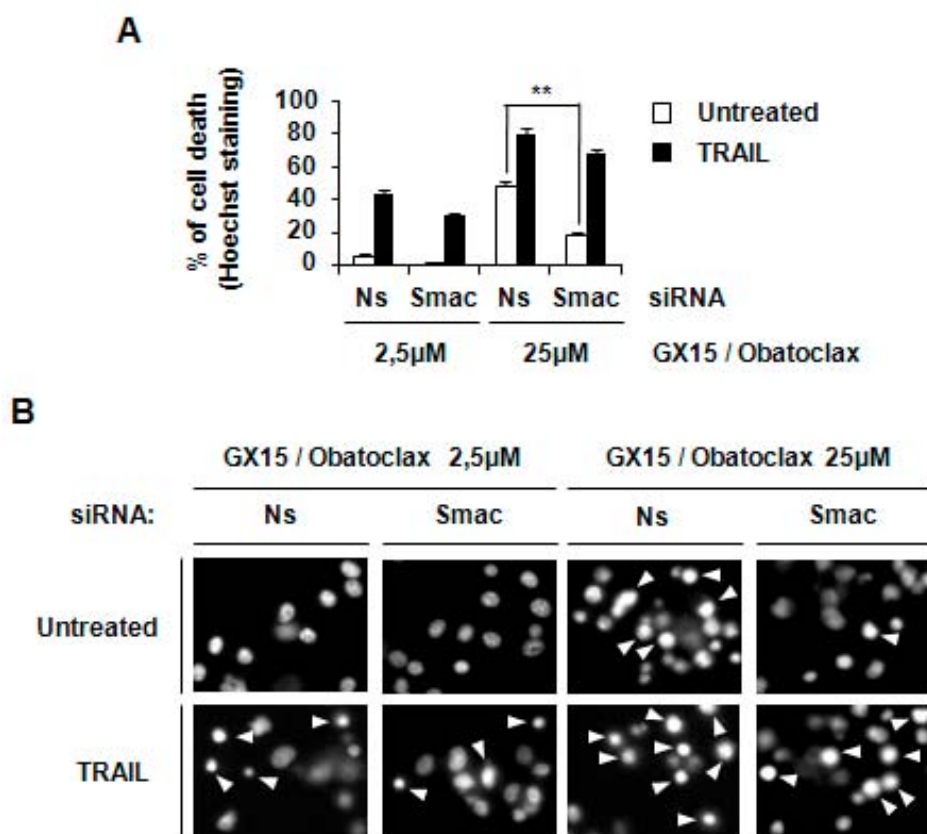
**Figura R26. El silenciament d'Smac / DIABLO no reverteix la citotoxicitat induïda pel co-tractament de TW-37 i TRAIL.** Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Smac / DIABLO. (A) Les cèl·lules es van tractar amb 5 o 25 µM TW-37 amb (barres negres) o sense (barres blanques) 50 ng/mL de TRAIL i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst.

En el cas de Gossypol, vam observar que la disminució de l'expressió d'Smac / DIABLO rescatava la mort induïda per Gossypol a la concentració de 50 µM (Figura R26). No obstant, el percentatge de mort induïda pel co-tractament amb TRAIL i Gossypol no va ser reduït per la presència del siRNA d'Smac / DIABLO (Figura R27).



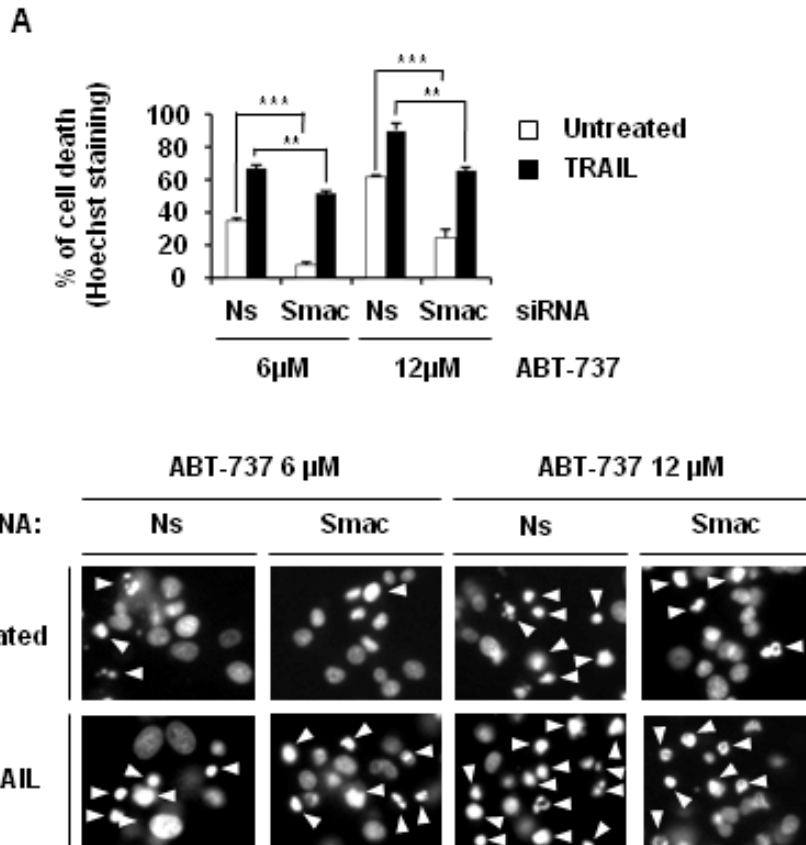
**Figura R27.** El silenciament d'Smac / DIABLO reverteix la citotoxicitat induïda per Gossypol però no la induïda per la combinació de Gossypol i TRAIL. Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Smac / DIABLO. (A) Les cèl·lules es van tractar amb 30 o 50 µM Gossypol amb (barres negres) o sense (barres blanques) 50 ng/mL de TRAIL i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst. \*\* P<0.005

En el cas de GX15 / Obatoclox, i de forma similar al Gossypol, el silenciament d'Smac / DIABLO va revertir de forma significativa la mort basal induïda pel *BH3-mimetic* a la concentració de 25 µM, però no va ser així en el cas de la mort cel·lular induïda pel co-tractament de TRAIL i GX15 / Obatoclox en cap de les dues concentracions testades.



**Figura R28.** El silenciament d'Smac / DIABLO és capaç de revertir la citotoxicitat basal induïda per GX15 / Obatoclastax però no la mort cel·lular induïda pel co-tractament de GX15 / Obatoclastax i TRAIL. Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Smac / DIABLO. (A) Les cèl·lules es van tractar amb 2,5 o 25 μM GX15 / Obatoclastax amb (barres negres) o sense (barres blanques) 50 ng/mL de TRAIL i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst. \*\* P<0.005

D'altra banda, els resultats observats en tractar les cèl·lules amb ABT-737, amb o sense TRAIL, van resultar interessants ja que la citotoxicitat induïda pel tractament cel·lular amb ABT-737 va ser revertida quan els nivells d'expressió d'Smac / DIABLO estaven regulats a la baixa (Figura R29). A més a més, en co-tractar les cèl·lules amb ABT-737 i TRAIL, també vam observar que el silenciament d'Smac / DIABLO va revertir parcialment aquest efecte tòxic (Figura R29).



**Figura R29. El silenciament d'Smac / DIABLO reverteix la citotoxicitat induïda tant per ABT-737 com pel co-tractament d'ABT-737 i TRAIL.** Les cèl·lules U87MG es van transfectar durant 3 dies amb un siRNA sense sentit (Ns) o amb el siRNA contra Smac / DIABLO. (A) Les cèl·lules es van tractar amb 6 o 12 µM d'ABT-737 amb (barres negres) o sense (barres blanques) 50 ng/mL de TRAIL i el percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives de la tinció nuclear amb Hoechst. \*\* P<0.005, \*\*\* P<0.001

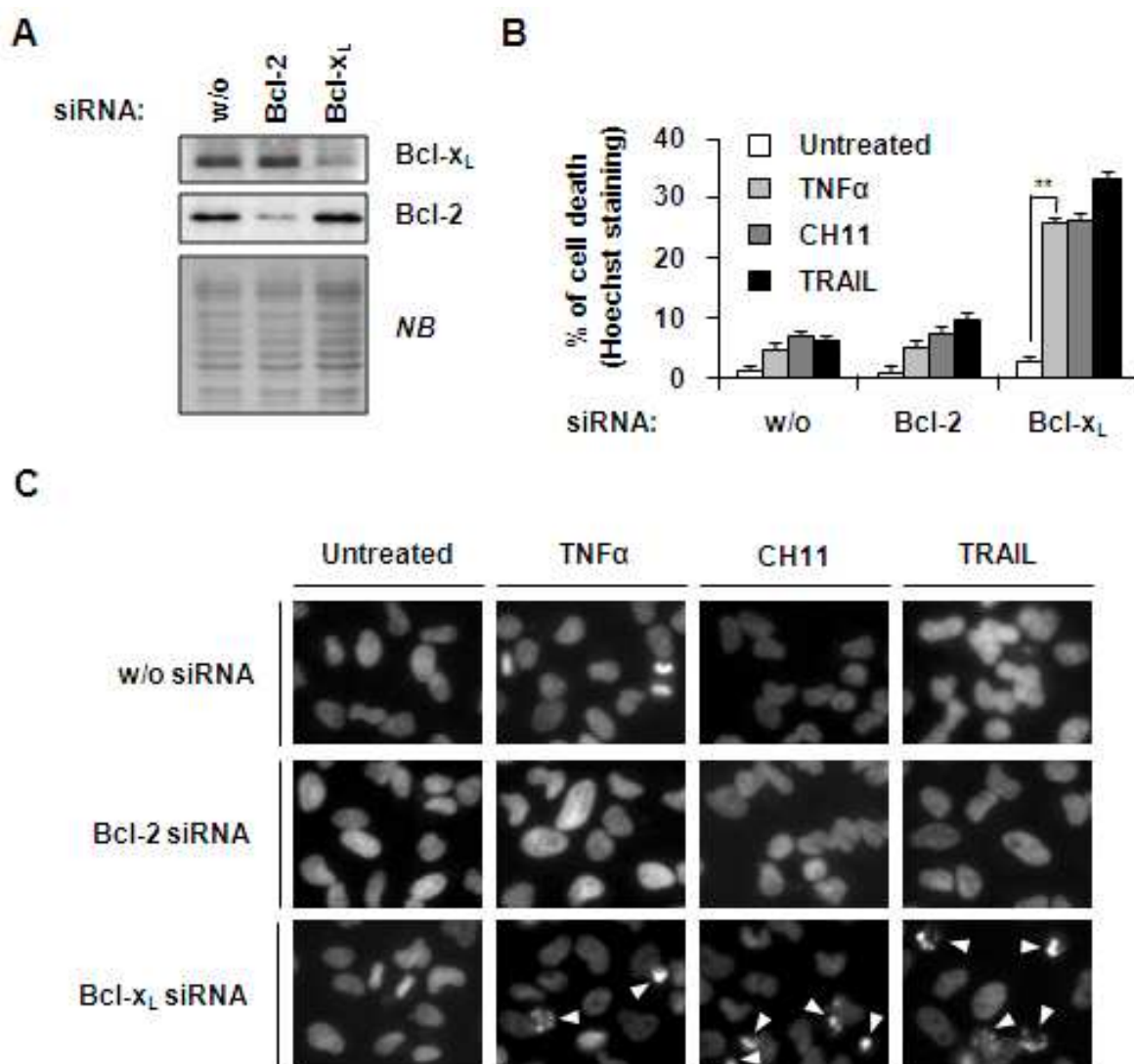
En conjunt, els nostres resultats suggereixen que Smac / DIABLO és una proteïna clau per al control de la citotoxicitat induïda per aquests inhibidors de forma basal. En canvi, i de forma sorprenent, els resultats demostren que l'acció citotòxica de TRAIL en presència d'un *BH3-mimetic* és independent d'Smac / DIABLO.



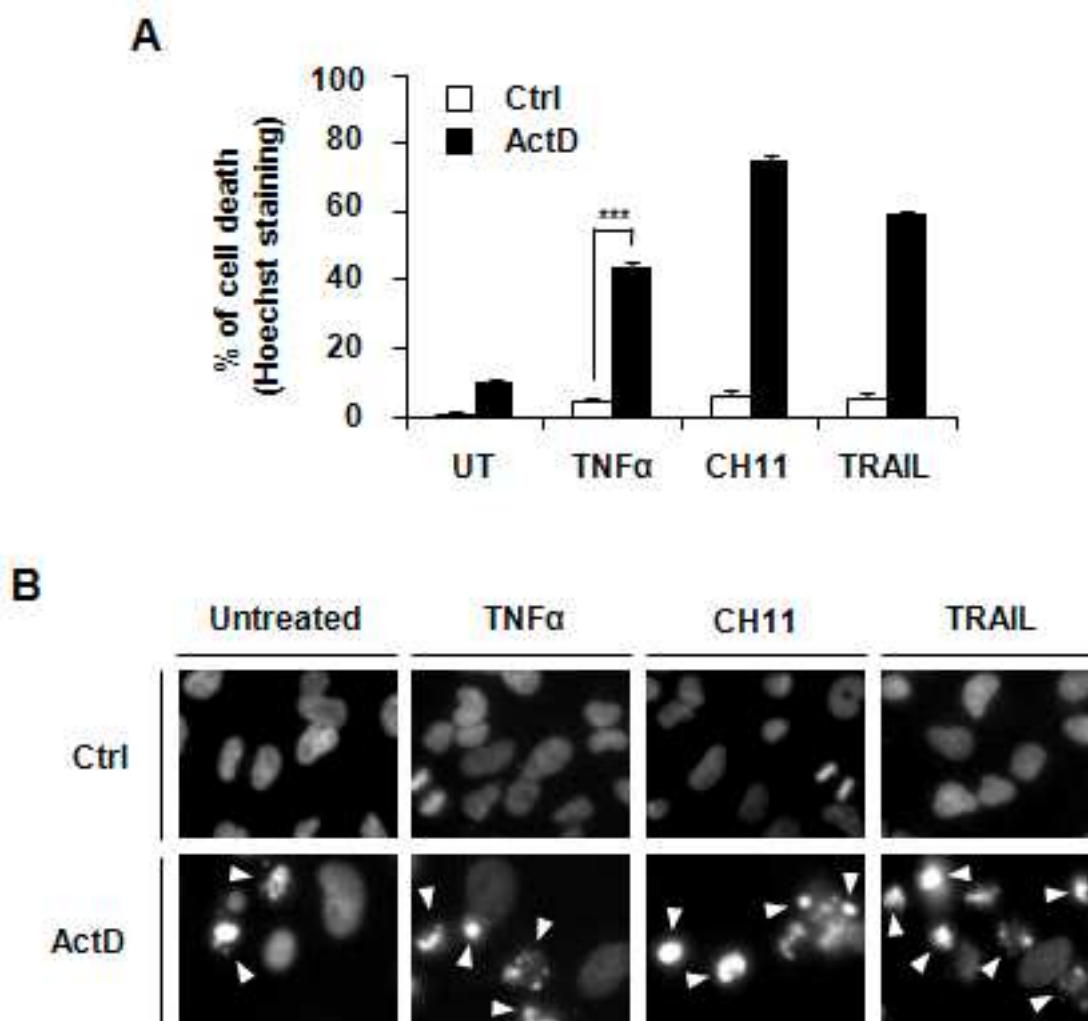


## Resultats annexes





**Figura Annexa 1. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitza les cèl·lules HeLa a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL.** Les cèl·lules HeLa van ser transfectades sense (w/o) siRNA, o amb el siRNAs contra Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> durant 3 dies. (A) Es van obtenir llistats totals de proteïna i els nivells proteïcs de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> van ser analitzats per *Western blot*. La membrana es va tenyir amb *naphthol blue* (NB) per comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. (B) Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL TNF $\alpha$ , 50 ng/mL de CH11 o 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenyir-los amb Hoechst 33258. (C) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenyir els nuclis amb Hoechst (fletxes). \*\* P<0.005



**Figura Annexa 2. L'actinomicina D sensibilitza les cèl·lules HeLa a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL.** Les cèl·lules es van deixar sense tractar o van ser tractades amb 100 ng/mL de TNF $\alpha$ , 50 ng/mL de CH11 o 50 ng/mL de TRAIL durant 24 h. (A) El percentatge de mort cel·lular va ser calculat comptant nuclis apoptòtics respecte nuclis totals després de tenir-los amb Hoechst 33258. (B) Imatges representatives que mostren la morfologia nuclear apoptòtica després de tenir els nuclis amb Hoechst (fletxes). \*\* P<0.005, \*\*\* P<0.001

*V.*

Discussió



## 1. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$ malgrat que NF- $\kappa$ B s'activi correctament en cèl·lules HeLa, RD i DU-145

En la primera part de resultats d'aquesta tesi, realitzada preferentment en cèl·lules HeLa, mostrem que tant la sobre-expressió d'un súper-repressor de NF- $\kappa$ B (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ ) com el silenciament específic de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w, és suficient per sensibilitzar les cèl·lules a la citotoxicitat induïda per TNF $\alpha$ . A més a més, el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no afecta a l'activació de NF- $\kappa$ B. Això indica que l'activació de NF- $\kappa$ B induïda per TNF $\alpha$  no és suficient per rescatar de l'apoptosi les cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciats. Resulta interessant, que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> en cèl·lules que sobre-expressen el SR-I $\kappa$ B $\alpha$  no té efectes de sensibilització additius a la mort induïda per TNF $\alpha$ . Globalment, els resultats obtinguts suggereixen que, tot i que NF- $\kappa$ B s'activi correctament, les cèl·lules exposades a TNF $\alpha$  moriran si Bcl-x<sub>L</sub> no és funcional.

Alguns càncers, tenen la capacitat de secretar TNF $\alpha$ , actuant com una senyal de supervivència autocrina dependent d'NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B promou l'expressió de molècules anti-apoptòtiques, com les clAPs, que normalment són requerides per mantenir la viabilitat de les cèl·lules cancerígenes en un ambient extracel·lular on TNF $\alpha$  és secretat (Petersen, Wang *et al.* 2007). Tot i així, NF- $\kappa$ B és un factor de transcripció pleiotròpic que s'activa, no només en cèl·lules tumorals, sinó també en resposta a l'estrès cel·lular tant fisiològic (com la selecció de cèl·lules T o la regeneració del fetge), com patològic (com a defensa contra infeccions virals o bacterianes) (Pahl 1999). A més, NF- $\kappa$ B juga un paper central en la resposta immune, activant diferents tipus de macròfags, que són un component essencial de la inflamació causada per la infiltració observada en la majoria dels tumors sòlids (Aggarwal and Sung 2011). Per aquest motiu, la inhibició no selectiva d'NF- $\kappa$ B podria promoure efectes nocius sobre l'organisme. Una aproximació prometedora seria la inhibició selectiva d'NF- $\kappa$ B en les cèl·lules tumorals sense afectar a les cèl·lules sanes, no tumorals. Malauradament, encara no s'ha reportat la manera de fer-ho (Aggarwal and Sung 2011). A més a més, s'ha descrit que molts dels fàrmacs que s'utilitzen actualment per tractar pacients de càncer també activen a NF- $\kappa$ B i es creu que la seva activació crònica, induïda pels agents quimioterapèutics, és un efecte secundari associat a

quimioresistència (Bharti and Aggarwal 2002). Per aquests motius, és de gran interès desenvolupar estratègies terapèutiques alternatives. En aquest sentit, recentment s'ha posat de manifest el valor de les molècules mimètiques d'Smac (*Smac mimetics*) com a inductors i/o sensibilitzadors de mort en tumors que secreten TNF $\alpha$ . Tot i així, la seva efectivitat depèn de l'expressió endògena de les cIAPs, principalment cIAP2 (Petersen, Peyton *et al.* 2010). D'altra banda, la seva efectivitat també hauria d'estar relacionada amb la dependència individual de cada població cel·lular, activant NF- $\kappa$ B per sobreviure a TNF $\alpha$ . De fet, un percentatge significant de cèl·lules cancerígenes són capaces de presentar respostes anti-apoptòtiques en front dels *Smac mimetics* (Varfolomeev, Blankenship *et al.* 2007) i, fins i tot, algunes cèl·lules tumorals poden sobreviure en presència d'*Smac mimetics* i TNF $\alpha$  (Petersen, Wang *et al.* 2007). Per tal d'explicar aquest fet, recentment s'ha postulat que les senyals de supervivència induïdes per TNF $\alpha$  a través de l'activació persistent d'NF- $\kappa$ B podrien fer virar les cèl·lules cap a un fenotip més resistent. Això és basa en el fet que els *Smac mimetics* no impedeixen l'activació de la via d'NF- $\kappa$ B i, per això, cIAP-2 continua estant regulat a l'alça de forma primerenca (Petersen, Peyton *et al.* 2010). De la mateixa manera, els nostres resultats mostren que el silenciament específic de Bcl-x<sub>L</sub> no impedeix la traducció *de novo* de c-IAP2, la qual cosa indica, d'una banda, que la funció transcripcional d'NF- $\kappa$ B no està alterada i, de l'altra, que l'activació d'NF- $\kappa$ B induïda per TNF $\alpha$  no és suficient per rescatar de la mort apoptòtica les cèl·lules que tenen Bcl-x<sub>L</sub> silenciats. En efecte, l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  ocorre sempre i quan la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub> estigui compromesa, perquè, per exemple, els seus nivells d'expressió es trobin reduïts. És interessant destacar que la repressió de l'activitat transcripcional d'NF- $\kappa$ B a través de la sobre-expressió del SR-I $\kappa$ B $\alpha$  no incrementa el percentatge d'apoptosi aconseguit amb l'estímul de TNF $\alpha$  quan Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciats. Això suggereix que la inhibició de la transcripció *de novo* dels gens anti-apoptòtics induïda per NF- $\kappa$ B no incrementa la sensibilització cel·lular a la mort induïda per TNF $\alpha$  quan els nivells proteics de Bcl-x<sub>L</sub> estan compromesos. En conjunt, els resultats indiquen que: NF- $\kappa$ B i Bcl-x<sub>L</sub> operen a través d'una via intracel·lular comuna, que la funció de supervivència exercida per NF- $\kappa$ B és dependent de la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub>, i que Bcl-x<sub>L</sub> controla els efectes biològics induïts per TNF $\alpha$  independentment de l'estat d'activació de NF- $\kappa$ B.



## **2. El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> juga un rol específic que no és compartit per Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w en la sensibilització a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$**

La rellevància de Bcl-x<sub>L</sub>, però també de Mcl-1, com a molècules anti-apoptòtiques clau ja ha estat descrita. El grup de Xiaodong Wang va demostrar de forma elegant que l'eliminació de les dues proteïnes, Mcl-1 i Bcl-x<sub>L</sub>, és un requisit per regular la resposta apoptòtica en front a diferents inductors citotòxics estimuladors de les vies apoptòtiques intrínseques com la radiació ultravioleta o l'etopòsid (Nijhawan, Fang *et al.* 2003). En aquest sentit, s'ha descrit que agents que causen dany a l'ADN, necessiten que Mcl-1 s'elimini o s'inactivi per permetre l'alliberament de la proteïna *BH3-only* Noxa. Una vegada alliberada, Noxa inhibeix a Bcl-x<sub>L</sub>, promovent així la disfunció de la mitocòndria i la mort cel·lular (Lopez, Zhang *et al.* 2010). Així doncs, la rellevància de la degradació de Mcl-1 recauria en l'alliberament de Noxa per bloquejar la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub>. També s'ha descrit que la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> o Mcl-1, però no de Bcl-2, sensibilitza a la mort cel·lular induïda per un estímul extrínsec com TRAIL (Weng, Li *et al.* 2005, Zhang, Lopez *et al.* 2011). En aquest sentit, els nostres resultats mostren que el silenciament de Mcl-1 provoca una tendència a la sensibilització a la mort induïda per TNF $\alpha$ , però aquest efecte no és tant potent com quan es tracten les cèl·lules amb un estímul intrínsec com l'etopòsid. Això suggereix que Bcl-x<sub>L</sub> podria unir-se a d'altres molècules diferents de Noxa i, per això, inclús després del silenciament de Mcl-1, Noxa no podria desplaçar-les. Per tant, l'eix Mcl-1-Noxa-Bcl-x<sub>L</sub>, que és essencial per a l'execució de la via intrínseca de mort, podria no ser tant important en l'execució de la via extrínseca. En aquest sentit, les nostres dades mostren que el silenciament específic de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w, és l'aproximació més eficient per sensibilitzar les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per un estímul extrínsec com TNF $\alpha$ .

A més, el fet que TNF $\alpha$  no promogui la degradació de Mcl-1 indica que, probablement, Noxa encara continuï segregat. Aquest fet és d'especial interès donat que la inhibició específica de la funció de Bcl-x<sub>L</sub> podria ser una eina terapèutica prometedora, especialment quan l'eix Mcl-1-Noxa-Bcl-x<sub>L</sub> no funcioni correctament. En qualsevol cas, un coneixement més detallat referent a les

molècules citotòxiques que uneixen a Bcl-x<sub>L</sub>, ens permetria dissenyar noves estratègies per regular-ne la seva funció anti-apoptòtica en, per exemple, tumors malignes deficients en Noxa, com per exemple alguns càncers pancreàtics (Ishida, Sunamura *et al.* 2008). De fet, podríem especular que la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> podria alliberar proteïnes potencialment citotòxiques segrestades per Bcl-x<sub>L</sub> i no per Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w. En resum, la inactivació del rol de supervivència de Bcl-x<sub>L</sub> és, en qualsevol cas, l'esdeveniment clau intercel·lular que permet l'activació de la senyalització apoptòtica en cèl·lules danyades. En conclusió, els nostres resultats situen a Bcl-x<sub>L</sub> com un interruptor molecular de vida i mort en front a l'estímul de TNF $\alpha$ , actuant de forma independent a l'activitat de NF- $\kappa$ B i dels nivells proteics de Mcl-1. Així doncs, el bloqueig específic de la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub> podria tenir un gran interès terapèutic.

### **3. Els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 podrien no ser tant redundants com s'ha especulat fins ara**

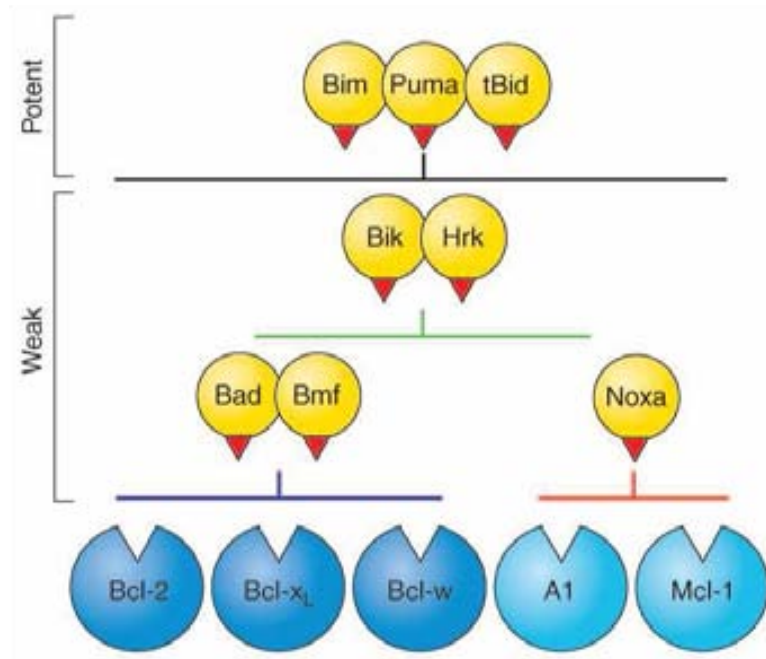
Durant anys, s'ha especulat que els diferents membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 exerceixen funcions redundants ja que tots ells indueixen supervivència cel·lular. S'ha reportat que existeix una expressió diferencial dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 tant en diferents tipus cel·lulars sans com en tumorals (Ross, Waymire *et al.* 1998, Opferman, Letai *et al.* 2003, Sorenson 2004, Strasser 2005). Això concorda amb els nostres resultats, que mostren que diverses línies cel·lulars presenten patrons diferents d'expressió dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2. De les deu línies cel·lulars analitzades a la segona part de la tesi, veiem que quatre d'elles (HeLa, RD, MIA Paca-2 i U87MG) expressen els quatre membres anti-apoptòtics; que HepG2, Panc1 i PC3 expressen Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 i Bcl-w; que A549 i HCT116 expressen Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w; i que DU-145 expressa Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1. Malgrat aquestes particularitats, un fet comú en totes elles és que expressen, en major o menor grau, Bcl-x<sub>L</sub>. D'altra banda, a la tercera part de la tesi, en analitzar diferents línies de glioblastoma observem que, de forma general, expressen els quatre membres anti-apoptòtics, a excepció de les cèl·lules U373MG que no expressen Bcl-2. La concepció general clàssicament acceptada respecte els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 és que exerceixen funcions biològiques redundants (Chao,

Linette *et al.* 1995). Malgrat això, resulta interessant destacar que cada cop hi ha més estudis que indiquen que les activitats de supervivència d'aquests estan regulades de forma diferent. El mecanisme pel qual els membres anti-apoptòtics exerceixen la seva funció biològica depèn de quines proteïnes *BH3-only* o proteïnes pro-apoptòtiques de la família de Bcl-2 uneix cada membre anti-apoptòtic. Aquestes interaccions s'han considerat promiscues durant anys, però cada cop existeixen més evidències que indiquen que les interaccions entre els membres de la família de Bcl-2 i les proteïnes *BH3-only* són altament específiques (Galonek and Hardwick 2006). Molts estímuls que indueixen l'apoptosi cel·lular requereixen l'activació final de Bax i Bak a la mitocondria per provocar la permeabilització de la membrana mitocondrial externa. Les proteïnes *BH3-only* juguen un paper clau en aquest procés. Tal i com s'ha explicat a la introducció, el model més acceptat es basa en que els *BH3-only* inicien aquest procés de forma jeràrquica i molt controlada. Així, no activen a Bax i Bak unint-s'hi de forma directa, sinó que ho fan de forma indirecta, unint i desplaçant les proteïnes anti-apoptòtiques que neutralitzen a Bax i Bak (Chen, Willis *et al.* 2005, Willis, Chen *et al.* 2005), però encara existeix controvèrsia sobre com ho fan.

S'ha descrit que els membres anti-apoptòtics interaccionen amb Bax i Bak per evitar que aquestes proteïnes es puguin oligomeritzar. Més concretament, estudis amb immunoprecipitacions i d'unió de pèptids *in vitro* mostren que Bak pot ser neutralitzat per Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1, però no per Bcl-2 ni Bcl-w (Willis, Chen *et al.* 2005, Willis, Fletcher *et al.* 2007). A més, s'ha descrit que la unió de Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1 a Bak es imprescindible per a protegir de la mort induïda per aquest (Nijhawan, Fang *et al.* 2003). En canvi, Bax pot ser neutralitzat per Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 i Bcl-w, però no per Mcl-1 (Cuconati, Mukherjee *et al.* 2003, Fletcher and Huang 2008).

D'altra banda, els membres anti-apoptòtics són inactivats (alliberant així a Bax i Bak) quan proteïnes *BH3-only* insereixen el seu domini BH3 en el solc de les proteïnes anti-apoptòtiques (Adams 2003). En aquest sentit, les proteïnes *BH3-only* Bim, Bid (Letai, Bassik *et al.* 2002, Kuwana, Bouchier-Hayes *et al.* 2005, Certo, Del Gaizo Moore *et al.* 2006) i PUMA (Cartron, Gallenne *et al.* 2004), són les proteïnes que estan més àmpliament acceptades com a *BH3-only* activadores. Aquestes es consideren activadors potents de Bax i Bak ja que s'ha

reportat que poden unir i neutralitzar tots els membres anti-apoptòtics (Willis and Adams 2005) (Figura D1). En canvi, la resta de *BH3-only* presenten cinètiques d'unió més dèbils als anti-apoptòtics que les que presenten Bim, Bid i PUMA i, probablement per aquest motiu, s'uneixen als membres anti-apoptòtics de forma més restringida. Així, s'ha descrit que Bik i Hrk neutralitzen a Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w i Bfl-1/A1; que Bad i Bmf neutralitzen a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w; i que Noxa s'uneix només a Mcl-1 i Bfl-1/A1 (Chen, Willis *et al.* 2005, Willis, Chen *et al.* 2005) (Figura D1). Aquesta especificitat en les interaccions entre els diferents membres de la família de Bcl-2, reforça la idea que aquestes proteïnes no actuen de forma redundant. De fet, donat que Bad i Noxa presenten perfils d'unió complementaris, alguns autors han suggerit que el procés d'apoptosi podria requerir la neutralització de dues classes de proteïnes anti-apoptòtiques, una que inclouria a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w, i l'altre que compendria Mcl-1 i Bfl-1 / A1. A més, mentre que Bad i Noxa es consideren activadors dèbils de la mort cel·lular, la seva acció combinada neutralitza de forma efectiva a tots els membres anti-apoptòtics i indueix apoptosi de forma potent (Chen, Willis *et al.* 2005). En canvi, tal i com ja s'ha mencionat, els nostres resultats mostren que la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> és suficient per sensibilitzar les cèl·lules a un estímul extrínsec de mort. Una possible explicació per aquest fet podria ser que Bcl-x<sub>L</sub> interacciona de manera específica neutralitzant a determinats *BH3-only* amb més afinitat que d'altres anti-apoptòtics. Així, quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada, aquests *BH3-only* específics serien alliberats i podrien realitzar les seves funcions pro-apoptòtiques. En aquest sentit, recentment s'ha reportat que Bcl-x<sub>L</sub> exerceix una regulació post-traducciona sobre els nivells d'expressió de Bad (Ezzoukhry, Louandre *et al.* 2011). Els autors demostren que la interacció de Bad amb Bcl-x<sub>L</sub> promou el *turnover* de Bad, impedint que aquesta exerceixi les seves funcions pro-apoptòtiques. En canvi, mostren que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> permet l'estabilització i l'acúmulo de Bad a la cèl·lula i que això indueix mort cel·lular (Ezzoukhry, Louandre *et al.* 2011). Tant aquestes dades com els nostres resultats indiquen que Bcl-x<sub>L</sub> exerceix un paper essencial en el control de l'apoptosi. Aquest podria ser el motiu pel qual és l'únic membre anti-apoptòtic que hem observat que s'expressa en tots els tipus cel·lulars analitzats, ja que la seva funció no podria ser substituïda per cap altre proteïna anti-apoptòtica.



**Figura D1.** Les proteïnes BH3-only s'uneixen de forma promiscua o selectiva a als membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2. Proteïnes BH3-only com Bim, Puma i tBid, neutralitzen tots els membres anti-apoptòtics i en conseqüència, són potents inductors de mort. La resta de proteïnes BH3-only, s'uneixen selectivament a diferents grups de proteïnes anti-apoptòtiques i per això la seva acció citotòxica és menys potent. Font (Willis and Adams 2005).

En conjunt, aquestes dades mostren la rellevància d'establir quines són les bases de la selectivitat de les interaccions entre aquests grups de proteïnes de la família de Bcl-2 i, especialment, d'identificar quines són les proteïnes que són neutralitzades per Bcl-x<sub>L</sub>. Aquest coneixement és important per entendre com s'inicia el procés de mort cel·lular i ajudarà a desenvolupar *BH3-mimetics* que tinguin com a dianes terapèutiques proteïnes anti-apoptòtiques de forma més selectiva.

#### 4. La resposta cel·lular de sensibilització o resistència a l'estímul de TNF $\alpha$ quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada és dependent del tipus cel·lular

TNF $\alpha$  és una citocina pleiotròpica que té funcions importants en immunitat i inflamació, així com en el control de la proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi. *In vivo*, TNF $\alpha$  és produït principalment pels macròfags i potencia la regressió tumoral induïda per les cèl·lules T citotòxiques (Baud and Karin 2001, Locksley, Killeen *et al.* 2001). Aquesta citotoxicitat sistèmica va fer

pensar que aquesta citoquina podia actuar com un agent anti-tumoral, ja que, per exemple, exhibeix una citotoxicitat preferencial per cèl·lules de càncer de mama malignes respecte les sanes (Dollbaum, Creasey *et al.* 1988). Cal tenir en compte que, desafortunadament, determinades cèl·lules tumorals no responen a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$  (Baisch, Otto *et al.* 1990, Chung, Mauceri *et al.* 1998, Panichakul, Wanun *et al.* 2002). Per exemple, un estudi en el qual es van analitzar cèl·lules d'adenocarcinoma de mama aïllades de pacients va mostrar que el 70% de les cèl·lules eren sensibles a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$ , però la resta eren resistents, no només a l'acció de TNF $\alpha$ , sinó també a l'acció combinada de TNF $\alpha$  i el fàrmac quimioterapèutic doxorubicina (Dollbaum, Creasey *et al.* 1988). De fet, el nombre de línies cel·lulars que resulten ser sensibles a l'apoptosi induïda per TNF $\alpha$  és limitat, ja que la majoria de línies cel·lulars en són resistents (Mutch, Powell *et al.* 1992). En canvi, sembla que la seva acció combinada amb la de fàrmacs quimioterapèutics redueix els efectes secundaris i incrementa el seu efecte (van Ijken, van Etten *et al.* 2000, Hambek, Solbach *et al.* 2001, Panichakul, Wanun *et al.* 2002).

Tal i com es mostra en els resultats, en analitzar un panell ampli de línies cel·lulars, hem observat diferents patrons de resposta a l'estímul de TNF $\alpha$ . Així, hem identificat tres línies cel·lulars (HCT116, Panc1 i LN18) que són sensibles a la mort induïda per TNF $\alpha$  de forma basal, mentre que la resta (HeLa, DU-145, RD, A549, HepG2, MIA PaCa-2, PC3, U87MG, A172, LN229, T98G, U251MG i U373MG) han resultat ser resistents. D'aquestes últimes, resulta interessant ressaltar que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> és suficient per sensibilitzar alguns tipus cel·lulars (HeLa, DU-145, RD, MIA PaCa-2 i PC3) a l'acció citotòxica de TNF $\alpha$ , però que d'altres línies cel·lulars (A549, HepG2 i diverses línies de glioblastoma: U87MG, A172, LN229, T98G, U251MG i U373MG) mantenen la seva resistència a TNF $\alpha$ . En el nostre model experimental, les cèl·lules es mantenen en medi de cultiu en presència de sèrum fetal boví i es tracten o no amb TNF $\alpha$ . Donat que TNF $\alpha$  pot promoure tant respostes de supervivència com de mort, és lògic preguntar-se quin o quins són els factors que inclinen la balança cap a una resposta apoptòtica en resposta a l'estímul de TNF $\alpha$ . En el nostre sistema experimental, els factors tròfics presents en el sèrum fetal boví podrien tenir un paper important, ja que es coneix que poden activar a NF- $\kappa$ B

(9572490;12947408} i, l'acció transcripcional d'NF-κB, podria decantar la balança cap a una resposta no apoptòtica. Centrarem aquest punt de la discussió en les cèl·lules que hem analitzat i que hem trobat que són resistents a TNFα, fins i tot en presència del siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> (A549, HepG2 i línies de GBM). Així, està establert que les cèl·lules HepG2, són insensibles a la citotoxicitat induïda per TNFα i que això pot ser degut a la inducció d'NF-κB per part de la citoquina (Leist, Gantner *et al.* 1994, Yoshikawa, Toyohara *et al.* 1999). D'altra banda, les cèl·lules A549 no només són resistents a TNFα, sinó que el pretractament amb la citoquina disminueix la mort induïda per Fas (Kastamoulas, Chondrogiannis *et al.* 2013). A més, aquests efectes protectors van ser atenuats amb inhibidors d'NF-κB. Per tant, van concloure que TNFα inhibia els efectes tòxics de Fas, al menys parcialment, a través de la transcripció de gens induïts per NF-κB i no per l'alteració dels nivells d'expressió de Fas. Finalment, s'ha reportat que la via d'NF-κB està constitutivament activada en una gran proporció de GBMs (Nagai, Washiyama *et al.* 2002, Lefranc, Brotchi *et al.* 2005). A més, TNFα promou supervivència en resposta a citoquines o factors de creixement que s'expressen de forma constitutiva en GBM i promouen la progressió del tumor i contribueixen a la resistència a la l'apoptosi induïda per TNFα (Sudheerkumar, Shiras *et al.* 2008).

Així doncs, en aquelles línies capaces de ser sensibilitzades a TNFα quan Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada, és possible que, de la mateixa manera que en les cèl·lules HeLa, l'activació d'NF-κB no sigui suficient per rescatar-les de la mort induïda per TNFα encara que Bcl-x<sub>L</sub> no sigui funcional. Per contra, en aquells tipus cel·lulars on la resistència a TNFα es manté fins i tot quan els nivells de Bcl-x<sub>L</sub> es regulen a la baixa, podríem especular que són resistents perquè transcripcionalment activen determinats factors i que, probablement, NF-κB juga un rol important. Els resultats d'aquesta tesi apunten que Bcl-x<sub>L</sub> està controlant l'alliberament d'Smac / DIABLO de la mitocòndria, al menys en GBM. Llavors, l'elevada inducció de l'expressió de les IAPs per part d'NF-κB en GBM, podria ser suficient com per atenuar o inhibir la funció pro-apoptòtica d'Smac / DIABLO. Així, el tipus de resposta que generen diferents tipus cel·lulars a TNFα quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada podria ser dependent, entre d'altres factors, dels nivells

d'expressió intrínsecs, dels nivells d'activació o dels nivells d'expressió dels gens regulats per factors com NF- $\kappa$ B, particulars per a cada tipus cel·lular.

Una altra possible hipòtesi que explicaria la resistència de les cèl·lules a la mort induïda per estímuls de la via extrínseca (TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL), és l'absència dels seus receptors en aquestes cèl·lules, tot i que existeixen evidències que fan que aquesta hipòtesi sigui poc probable. Es coneix que moltes de les línies cel·lulars que són resistents a l'acció citotòxica dels "receptors de mort" són dependents de la síntesi de proteïnes per exercir aquesta resistència. En aquest sentit, ha estat descrit que tant cèl·lules HepG2 com hepatòcits aïllats de ratolí són insensibles a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$ , però el co-tractament amb inhibidors de la síntesi macromolecular com actinomicina D o cicloheximida les sensibilitza a la mort induïda per la citoquina (Leist, Gantner *et al.* 1994). De fet, tant al nostre laboratori (Figura Annexa 2), com en d'altres (Drimal, Drimal *et al.* 2006), s'ha observat que les cèl·lules HeLa, que són resistents a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL, poden ser sensibilitzades en presència d'actinomicina D. Hem observat el mateix en les cèl·lules de glioblastoma U87MG. Com que no s'ha reportat que el mecanisme pel qual l'actinomicina D sigui degut a un increment en l'expressió dels components del DISC, podem afirmar que tant les cèl·lules HeLa com les cèl·lules U87MG disposen de tota la maquinària per activar la via extrínseca de mort induïda per TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL i, per tant, podríem assumir que l'inici de la cascada mitjançada pels "receptors de mort" és adequada, així com l'expressió dels mateixos.

## **5. La mort induïda pel silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> i l'estímul de TRAIL és apoptòtica i no necròtica**

L'activació de la via extrínseca pot induir tant apoptosi com necrosi. Tal i com s'ha explicat anteriorment, es creia que la necrosi, contràriament a l'apoptosi, era un tipus de mort accidental, conseqüència de dany cel·lular causat per patògens o toxines. Posteriorment, s'ha demostrat que existeix un tipus de necrosi, anomenat necroptosi, que resulta ser un tipus de mort programada (Degterev, Hitomi *et al.* 2008). Tres descobriments han estat claus per



caracteritzar tant la necroptosi com la relació entre apoptosi i necroptosi. En primer lloc, es va observar que l'activitat enzimàtica de les proteïnes RIPK1 (Holler, Zaru *et al.* 2000) i RIPK3 (Cho, Challa *et al.* 2009, He, Wang *et al.* 2009) és essencial per a l'execució de la necroptosi, ja que les dues proteïnes formen un complex anomenat necroptosoma. En segon lloc, es va demostrar que la caspasa-8 pot processar tant RIPK1 com RIPK3, inhibint així la seva funció en la inducció de mort cel·lular independent de caspasa (Lin, Devin *et al.* 1999, Feng, Yang *et al.* 2007). Aquests estudis demostren que existeix una relació entre el DISC i el necroptosoma. L'activació de la mort en el nostre paradigma, on silenciem els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i estimulem les cèl·lules amb TRAIL, és apoptòtica i no necròtica. Això es posa de manifest tant perquè el q-VD-OPh, i no la Necrostatina-1, és capaç d'inhibir la mort cel·lular, com perquè es produeix l'activació de les caspases. A més a més, la caspasa-8 és necessària perquè es produeixi aquesta mort i, en el nostre sistema, actua com a caspasa apical. Això és interessant perquè l'apoptosi i la necrosi, tot i que són diferents mecanismes de mort cel·lular, estan relacionades a través de caspasa-8. Per tant, aquestes dades recolzen la idea que, en el nostre sistema, la mort cel·lular és exclusivament apoptòtica. Podríem especular que TRAIL no és capaç d'induir necroptosi en absència de Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8 i, per tant, situar Bcl-x<sub>L</sub> com una molècula totalment anti-apoptòtica. Per confirmar aquesta hipòtesi, caldria analitzar el percentatge de mort causat per l'estímul de TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> i caspasa-8 estan silenciats amb d'altres mètodes diferents a la morfologia nuclear. Algun d'aquests mètodes inclouen la mesura de viabilitat per l'exclusió de Tripán Blue o la mesura de la integritat de les membranes a través de l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa. De totes maneres, el fet que q-VD-OPh produeixi el rescat complet de la mort cel·lular, suggereix que probablement Bcl-x<sub>L</sub> no pugui provocar un canvi del mecanisme de mort cap a necroptosi.

Un altre punt important a discutir és el mecanisme pel qual una proteïna mitocondrial com Bcl-x<sub>L</sub> pot influenciar a la mort induïda per via extrínseca a través de TRAIL i regular, d'alguna manera, l'activació de caspasa-8. En aquest sentit, RIPK1 i la formació del ripoptosoma podrien tenir un rol important. En condicions normals, RIPK1 promou supervivència, però en absència de les cIAPs, RIPK1 és reclutat al ripoptosoma (Bertrand, Milutinovic *et al.* 2008,

Geserick, Hupe *et al.* 2009). El ripoptosoma és una plataforma inductora de mort que conté tres components bàsics: RIPK1, FADD i caspasa-8 o -10 i es forma en resposta a l'estrés genotòxic induït per la inhibició de les IAPs. Les isoformes de cFLIP actuen regulant la formació del ripoptosoma: cFLIP<sub>L</sub> l'inhibeix mentre que cFLIP<sub>S</sub> en promou la formació (Feoktistova, Geserick *et al.* 2011, Tenev, Bianchi *et al.* 2011). La formació d'aquest complex de mort requereix l'activitat kinasa de RIPK1, en canvi, es forma independentment dels "receptors de mort" i de la via mitocondrial. Així doncs, en absència de les IAPs, l'activitat de caspasa-8 està controlada per RIPK1 i per les isoformes de cFLIP al ripoptosoma, que poden promoure la mort cel·lular a través de la necroptosi o de l'apoptosi (Feoktistova, Geserick *et al.* 2011). En el mateix estudi també descriuen que els *Smac mimetics* indueixen la formació del ripoptosoma a través del seu efecte inhibitori sobre les IAPs (Tenev, Bianchi *et al.* 2011). En un altre treball, demostren que molècules inhibidores de IAPs utilitzades a concentracions subletals cooperen amb els anticossos monoclonals agonistes de TRAIL-R1 (Mepatumumab) o de TRAIL-R2 (Lexatumumab) per induir apoptosi en cèl·lules del neuroblastoma de forma sinèrgica (Abhari, Cristofanon *et al.* 2012). A més, identifiquen a RIPK1 i a la formació del ripoptosoma com a factors clau d'aquest sinergisme, ja que el silenciament de RIPK1 o la inhibició de l'activitat kinasa de RIPK1, mitjançant Necrostatina-1, inhibeix la mort induïda per la combinació de TRAIL i molècules inhibidores de IAPs (Abhari, Cristofanon *et al.* 2012). Així doncs, una possible explicació dels nostres resultats podria ser que, en presència de TRAIL, el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> permetria l'alliberament d'Smac / DIABLO de la mitocòndria permetent d'aquesta forma la inhibició de les IAPs. Aquest, podria ser el factor determinant per a la formació del Ripoptosoma que podria activar la mort dependent de caspasa-8, al menys en cèl·lules de GBM.

D'altra banda, un dels resultats que vam obtenir ens va permetre una observació puntual. S'ha descrit que una mateixa cèl·lula quan és estimulada amb FasL pot morir tant per la via tipus I, independent de mitocòndria, com per la via tipus II, que depèn de la mitocòndria. La molècula clau que controla aquest canvi és XIAP, ja que quan la seva expressió es veu disminuïda permet que cèl·lules de tipus II, com hepatòcits o cèl·lules beta pancreàtiques, esdevinguin

independents de Bid i puguin morir com a tipus I (Jost, Grabow *et al.* 2009, Hao and Mak 2010). Els nostres resultats mostren que, en tractar les cèl·lules U87MG que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> amb els tres inductors de via extrínseca, obtenim diferents respostes segons quin receptor s'està activant. Quan tractem aquestes cèl·lules amb TNF $\alpha$ , veiem que el metabolisme cel·lular funciona correctament (observat a partir del potencial reductor de la cèl·lula a través de l'assaig MTT) i que els nuclis cel·lulars presenten una morfologia normal (tinció de Hoechst). En canvi, l'acció de Fas (a partir de l'anticòs agonista CH11), no altera el metabolisme cel·lular encara que s'observa condensació dels nuclis. Per últim, en estimular les cèl·lules amb TRAIL, veiem que els nuclis presenten condensació i que el metabolisme cel·lular es troba alterat. Així, quan Bcl-x<sub>L</sub> no és funcional, la inducció de la mort a través del receptor de Fas sembla ser que no requereix la mitocòndria i les cèl·lules es comporten com a tipus I, mentre que l'apoptosi induïda per TRAIL requereix la participació de la mitocòndria. Aquest fet podria ser degut a l'existència de poblacions cel·lulars diferents que puguin ser sensibilitzades per FasL o per TRAIL. En aquest sentit, en un altre estudi s'utilitzen cèl·lules T que són capaces de respondre tant a FasL com a TRAIL, i s'observa que el tractament de les cèl·lules amb FasL o TRAIL induïx apoptosi, però que el co-tractament de FasL i TRAIL no induïx un efecte citotòxic sinèrgic (Snell, Clodi *et al.* 1997). Aquestes dades suggereixen que seria interessant avaluar si el co-tractament de FasL i TRAIL provoca un efecte sinèrgic en les cèl·lules U87MG que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>. Podríem hipotetitzar tres possibilitats. En primer lloc, l'efecte combinat de FasL i TRAIL podria ser sinèrgic. En aquest cas, la sinèrgia podria ser deguda o bé a que un dels lligands potenciés l'acció de l'altre, o bé a que existissin diferents poblacions cel·lulars capaces de respondre diferencialment a FasL o TRAIL, tot i que aquesta última opció, només es podria contemplar en el cas que el percentatge de mort cel·lular obtingut amb el co-tractament fos com a mínim el doble que el percentatge de mort obtingut amb els tractaments individuals. En aquest últim supòsit, si el percentatge de mort obtingut després del co-tractament amb FasL i TRAIL fos més del doble en comparació amb els tractaments individuals, aquest percentatge addicional podria ser atribuït o bé a la cooperació entre FasL i TRAIL per induir mort cel·lular, o bé a l'existència d'una població cel·lular que només respongués en presència dels dos inductors a la vegada. En

segon lloc, la mort cel·lular induïda per FasL i TRAIL podria no ser sinèrgica. Això podria significar o bé que les cèl·lules que moren en resposta a FasL i TRAIL són les mateixes, o bé que en presència dels dos inductors predomina la via d'activació d'un d'ells. En tercer i últim lloc, si l'acció de FasL i TRAIL induís un percentatge de mort inferior al generat amb FasL o TRAIL individualment, significaria que les dues vies són antagoniques. En qualsevol cas, estudiar si FasL i TRAIL podrien produir un efecte citotòxic sinèrgic o no, seria molt rellevant per a entendre els mecanismes de resistència de les cèl·lules a la citotoxicitat induïda pels receptors de mort.

## **6. L'especificitat de Bcl-x<sub>L</sub> per protegir les cèl·lules U87MG de la mort cel·lular depèn de l'alliberament d'Smac / DIABLO**

El fet que els nostres resultats demostren que la mort induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada causa l'alliberament de la mitocòndria cap al citosol tant de citocrom c com d'Smac / DIABLO, fa interessant estudiar la influència que els factors pro-apoptogènics exerceixen sobre el control d'aquesta mort. La inhibició de l'expressió de citocrom c no és possible experimentalment en condicions aeròbiques ja que les cèl·lules no podrien sobreviure (Li, Li *et al.* 2000). Per això ens hem centrat en estudiar els efectes de la inhibició de l'expressió d'Smac / DIABLO en la citotoxicitat induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada. Els resultats obtinguts són interessants, ja que si els nivells proteics d'Smac / DIABLO es veuen compromesos, TRAIL no pot induir citotoxicitat en cèl·lules que tenen l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> disminuïda. Cal esmentar que també ens vam plantejar estudiar l'efecte de la inhibició de HtrA2 / Omi, ja que és la segona proteïna mitocondrial que s'ha assenyalat com inhibidora de les IAPs; però el fet que el silenciament d'Smac / DIABLO sigui capaç de revertir per complet la mort cel·lular induïda per TRAIL quan Bcl-x<sub>L</sub> està silenciada, fa pensar que la seva funció no és redundant. De totes maneres, no podem descartar que HtrA2/ Omi estigui exercint alguna funció en aquest paradigma experimental. En conjunt, aquests resultats suggereixen que Bcl-x<sub>L</sub> està controlant la funció d'Smac / DIABLO, tot i que el mecanisme pel qual Bcl-x<sub>L</sub> exerceix aquest control encara s'ha d'elucidar.

En aquest sentit, és fa interessant discutir l'efecte del silenciament d'Smac / DIABLO sobre l'activació de les caspases des d'un punt de vista bioquímic. Els resultats presentats en aquesta tesi són preliminars i, per tant, no són suficients com per treure conclusions, però sí que és important discutir-ne alguns aspectes.

En primer lloc, els resultats mostren que TRAIL, en major o menor grau, provoca el processament de caspasa-8. En el cas de cèl·lules transfectades amb un siRNA sense sentit o amb el siRNA contra Smac / DIABLO, l'estímul de TRAIL provoca el processament de caspasa-8 en els seus fragments p43/p41 (tot i que s'observen amb menys intensitat en comparació amb les cèl·lules que tenen Bcl-x<sub>L</sub> silenciats i s'estimulen amb TRAIL). Aquests fragments de caspasa-8, promouran el processament de caspasa-9 (Denault, Eckelman *et al.* 2007) en els seus fragments actius p35 i p37 (en el cas de cèl·lules transfectades amb un siRNA sense sentit) o només p37 (en les cèl·lules transfectades amb el siRNA contra Smac / DIABLO). Finalment, caspasa-8 (p43/p41) o bé els fragments de caspasa-9 (p35 i p37), processaran a caspasa-3 en el seu fragment p20 (Denault, Eckelman *et al.* 2007). El processament diferencial de caspasa-9 induït per TRAIL en cèl·lules transfectades amb un siRNA sense sentit o amb el siRNA contra Smac / DIABLO, suggereix que Smac / DIABLO és necessari per al processament del fragment p35. Aquest punt es discutirà més endavant.

En tractar tant les cèl·lules transfectades únicament amb el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub> com les cèl·lules co-transfectades amb els siRNAs contra Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO amb TRAIL, caspasa-8 és activada i s'observa que les bandes dels seus fragments actius són més intenses en comparació amb les cèl·lules control transfectades amb un siRNA sense sentit, especialment en les cèl·lules que només tenen Bcl-x<sub>L</sub> silenciats. Probablement per aquest motiu, quan s'inhibeix Bcl-x<sub>L</sub>, l'activació de caspases és suficient per generar toxicitat cel·lular i les cèl·lules moren en resposta a TRAIL. Per contra, el co-silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, impedeix la mort cel·lular en resposta a l'estímul citotòxic de TRAIL malgrat les caspases s'estan activant de forma aparent. Més concretament, en cèl·lules que tenen Bcl-x<sub>L</sub> silenciats, l'activació de caspasa-8 seria suficient per processar correctament tant a caspasa-3 en el seu fragment p20 com per a induir l'auto-proteòlisi de caspasa-9 en el seu fragment p35. Podem observar que la via predominant d'activació de caspasa-9 és l'auto-

processament i que s'observen tots els fragments d'activació de caspasa-3 (p19 i p17), així com els fragments d'activació de caspasa-6 i -7. En canvi, en les cèl·lules on hem silenciats Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, l'activació de caspasa-8 és menor que en cèl·lules amb només el siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>, probablement perquè no es dona el *loop* d'amplificació cap a una major activació de caspasa-8. El fet que XIAP podria encara estar fent la seva acció inhibidora sobre les caspases degut a l'absència d'Smac / DIABLO, podria provocar que l'eix d'amplificació caspasa-9-p35 → caspasa-3 p20 → caspasa-9 p37 no fos tant potent com seria si Smac / DIABLO fos alliberat al citosol. Llavors, donat que en les cèl·lules que tenen Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO silenciats observem que l'activació de caspasa-9 es dona principalment en el seu fragment p37 (processat per caspasa-3), cal plantejar-se quin grup de caspasa-3 està produint aquesta activació. Podríem especular que la caspasa-3, que és activada per caspasa-8, podria estar processant a p37, indicant que, en absència d'Smac / DIABLO, la via d'activació inicial de caspasa-9 és de tipus I i no de tipus II, independentment de si la cèl·lula necessita o no la mitocòndria per morir. És sorprenent que quan l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO es troben silenciades s'observa que les caspases es troben aparentment activades, malgrat que no s'observa mort cel·lular en comparació amb la condició control, on les cèl·lules estan transfectades amb un siRNA sense sentit. En aquest sentit, caldria diferenciar l'activació de les caspases de la seva activitat i, en els nostres resultats, aquest fet es posa de manifest quan s'analitzen amb més detall els substrats de les caspases. Així, el processament dels substrats de les caspases es veu clarament inhibit pel silenciament d'Smac / DIABLO i això apunta que, tot i que s'hagi produït el processament de les caspases, l'activitat d'aquestes podria estar inhibida. Donat que la funció principal d'Smac / DIABLO és la d'inhibir a les IAPs i que s'ha reportat que cIAP1 i cIAP2 no modulen l'activació però si l'activitat de les caspases (Huang, Joazeiro *et al.* 2000, Zimmermann, Bonzon *et al.* 2001, Cummins, Kohli *et al.* 2004, Varfolomeev, Blankenship *et al.* 2007, Choi, Butterworth *et al.* 2009), podríem especular que cIAP1 i cIAP2 podrien tenir un paper important en la inhibició de l'activitat de caspases ja activades, tot i que no podem descartar que existeixin altres proteïnes que puguin exercir aquesta modulació. Una altra possible explicació al fenomen de supervivència en presència de caspases activades, seria que

existeix un llindar mínim d'activació de les caspases necessari perquè es produeixi la mort cel·lular.

El fet que l'activació del fragment p35 de caspasa-9 sigui més dèbil tant en les cèl·lules on hem silenciats només Smac / DIABLO com en aquelles on hem silenciats Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, suggereix que Smac / DIABLO podria promoure el mecanisme d'auto-processament del fragment p35 de caspasa-9. En la literatura s'ha descrit que la pro-caspasa-9 pot ser processada tant per la caspasa-3, generant el fragment p37 (que té menys afinitat per XIAP) (Zou, Yang *et al.* 2003), com per auto-proteòlisi, generant el fragment p35 (que té molta afinitat per XIAP) (Srinivasula, Hegde *et al.* 2001, Denault, Eckelman *et al.* 2007, Twiddy and Cain 2007). La funció principal d'Smac / DIABLO és inhibir a les IAPs, i d'aquestes, XIAP és l'única IAP de mamífer que funciona com un inhibidor directe de les caspases en un sentit estrictament bioquímic (Eckelman, Salvesen *et al.* 2006). També s'ha reportat que Smac / DIABLO actua desplaçant a XIAP (que s'uneix i inactiva els dos fragments actius p35 i p37 de caspasa-9) per permetre una forta activació de caspasa-9 (Zou, Yang *et al.* 2003). Els nostres resultats suggereixen que l'absència de Smac / DIABLO en les cèl·lules dificulta l'auto-processament de caspasa-9 cap al fragment p35 i això es podria donar si XIAP fos capaç d'inhibir a la mateixa pro-caspasa-9. Malgrat això, la inhibició de XIAP sobre pro-caspasa-9 no ha estat descrita. Aquest fet resulta interessant ja que els nostres resultats ens demostren que el silenciament de XIAP en cèl·lules que tenen reduïda l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO, no és suficient per tornar a sensibilitzar-les a la mort induïda per TRAIL. Per tant, els nostres resultats apunten a que l'acció principal d'Smac / DIABLO no es dona sobre l'acció anti-apoptòtica de XIAP o, com a mínim, que la inhibició de XIAP no seria suficient per recuperar la citotoxicitat en cèl·lules on s'ha silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO. Una hipòtesi que explicaria aquest fet, seria que quan l'expressió de XIAP es troba silenciada, les altres IAPs podrien adquirir un rol més central en la inhibició de les caspases que compensés la falta de XIAP. De totes maneres, calen més dades per demostrar aquest fet, ja que els coneixements actuals apunten que XIAP exerceix determinades funcions que no poden ser realitzades per les altres IAPs. Per exemple, les anàlisis mutacionals indiquen que únicament XIAP és capaç d'inhibir a caspasa-9

processada (Sun, Cai *et al.* 2000). Per tant, conèixer els mecanismes íntims que regulen les interaccions entre les caspases, les IAPs i Smac / DIABLO, seria clau per entendre com es produeix el procés de mort i per poder dissenyar noves estratègies terapèutiques.

D'altra banda, no podem descartar que altres proteïnes que posseeixin un motiu AVPI d'unió a les IAPs (IBM) com el que presenta Smac / DIABLO (Chai, Du *et al.* 2000, Srinivasula, Datta *et al.* 2000) puguin actuar inhibint tant a les IAPs com a altres possibles proteïnes moduladores de l'activitat de les caspases. En aquest sentit, s'han identificat altres proteïnes mitocondrials en mamífers que posseeixen un IBM i que, *in vitro*, poden unir-se als dominis BIR2 tant de XIAP com de cIAP1, però no al BIR3 que, en el cas de XIAP, és el domini principal d'unió i inhibició de la caspasa-9 (Verhagen, Kratina *et al.* 2007). Algunes d'aquestes proteïnes són: GdH (de l'anglès, glutamate dehydrogenase), Nsp3 i 4 (Nipsnap 3 i 4), CLPX (de l'anglès, Caseinolytic Peptidase X Homolog), LRPPR (de l'anglès, leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein) i 3HB (de l'anglès, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase). Tot i que es desconeix si aquestes proteïnes amb IBMs tenen un rol pro-apoptogènic, el fet que el ratolí deficient per Smac / DIABLO presenti un fenotip normal (Okada, Suh *et al.* 2002), suggereix que altres molècules capaces d'unir-se a les IAPs estarien compensant la pèrdua d'Smac / DIABLO. A més a més, l'observació que les cèl·lules d'un ratolí doblement deficient per Smac / DIABLO i per HtrA2 / Omi no incrementin la seva resistència a la mort cel·lular en comparació amb el ratolí deficient únicament per Smac / DIABLO, suggereix que la compensació de la pèrdua d'aquest és deguda a altres molècules inhibidores de les IAPs, diferents a HtrA2 / Omi (Martins, Morrison *et al.* 2004). En aquest aspecte, s'ha descrit que les proteïnes amb IBMs abans mencionades antagonitzen la inhibició de XIAP sobre la caspasa-3, encara que no sensibilitzen a l'apoptosi per radiació ultravioleta (Verhagen, Kratina *et al.* 2007). Els mateixos autors hipotetitzen que aquest fet podria ser degut a que aquestes proteïnes amb IBMs s'uneixen només al domini BIR2, i no al BIR3 de XIAP, fet que dificultaria el desplaçament de XIAP sobre la caspasa-9 i, per tant, no es podria donar la cascada proteolítica de caspases malgrat la pro-caspasa-3 es trobi alliberada de XIAP (Verhagen, Kratina *et al.* 2007). Per tant, i només centrant-nos en XIAP, sembla evident que



és necessària, com a mínim, l'acció de dos tipus de proteïnes amb IBMs: unes que uneixin a BIR3 (com Smac / DIABLO i HtrA2 / Omi) i altres que uneixin a BIR2, i no a BIR3. Les primeres podrien estar actuant a nivell apical en quant a l'activació de caspases i, les segones, exercirien la seva acció sobre les caspases executores. Així, el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no només provocaria la sortida d'Smac / DIABLO al citosol, sinó que també estaria produint l'alliberament d'altres proteïnes mitocondrials amb IBMs. Per tant, en cèl·lules que tenen silenciada l'expressió tant de Bcl-x<sub>L</sub> com d'Smac / DIABLO, encara que no morin en front a l'estímul citotòxic de TRAIL, aquestes proteïnes amb IBMs podrien actuar desplaçant a les IAPs de les caspases executores i això podria explicar, en part, perquè observem l'activació d'aquestes.

Malgrat això, el fet que el silenciament de XIAP en cèl·lules que tenen reduïda l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Smac / DIABLO no sigui suficient per tornar a sensibilitzar-les a la mort induïda per TRAIL, fa pensar en l'existència d'altres mecanismes de regulació de l'activació de caspasa-9 independents de les IAPs. Per exemple, en extractes cel·lulars *in vitro*, ERK / MAPK (de l'anglès, *extracellular signal-regulated kinases* / *mitogen-activated protein kinases*) pot inhibir a caspasa-9 fosforilant-la (Allan, Morrice *et al.* 2003). En aquest sentit, el nostre laboratori ha reportat recentment que l'activació de ERK / MAPK requereix l'activació de cFLIP<sub>L</sub> promoguda per NF-κB (Marques-Fernandez, Planells-Ferrer *et al.* 2013). A més a més, recentment també s'ha descrit que ratolins deficients per Smac / DIABLO presenten un augment en els nivells d'expressió de cIAP1 i cIAP2, un increment tant en la proliferació cel·lular com en l'activació de la subunitat p65 d'NF-κB, en teixits normals i tumorals (Qiu, Liu *et al.* 2013). Els mateixos autors demostren que el dèficit d'Smac / DIABLO incrementa l'activació d'NF-κB induïda per TNFα en cèl·lules HCT116. Aquestes dades suggereixen que, en el nostre paradigma experimental, el silenciament d'Smac / DIABLO podria provocar un increment en l'activació d'NF-κB, un augment en l'expressió de cFLIP<sub>L</sub> que, a la vegada, activaria la via d'ERK / MAPK provocant així la fosforilació i inhibició de caspasa-9.

Finalment, resulta interessant destacar que, en molts tumors, existeixen nivells elevats de IAPs, la qual cosa correlaciona amb una mala prognosi (Yang, Cao *et al.* 2003). Això suggereix que l'ús d'antagonistes de les IAPs, que

mimetitzen la funció de Smac / DIABLO (en anglès, *Smac mimetics*), podria esdevenir una estratègia terapèutica per al tractament d'aquest tipus de tumors (Vucic and Fairbrother 2007). És per això que diversos grups han desenvolupat molècules peptídiques, mimètiques dels IBMs, que s'uneixen de manera selectiva i amb gran afinitat als diferents dominis BIR de les IAPs, més efectivament a cIAP1 i cIAP2 (Vucic and Fairbrother 2007). Tot i que diverses línies cel·lulars cancerígenes han resultat ser sensibles al tractament amb *Smac mimetics*, la major part d'elles en són resistents (Petersen, Wang *et al.* 2007, Cheung, Mahoney *et al.* 2009). S'ha reportat que aquesta resistència es troba associada a l'absència de producció de TNF $\alpha$  per part d'aquestes cèl·lules i que el tractament conjunt d'*Smac mimetics* i TNF $\alpha$  sensibilitza a les cèl·lules, en un principi resistents a la mort induïda per la citoquina (Petersen, Wang *et al.* 2007, Varfolomeev, Blankenship *et al.* 2007, Verhagen, Kratina *et al.* 2007). La rellevància d'aquestes investigacions ha fet que s'hagin realitzat diversos assaigs clínics en fase I emprant *Smac mimetics*, testant la seva seguretat, tolerabilitat i perfils farmacocinètics en pacients amb tumors sòlids avançats i limfomes (Allensworth, Sauer *et al.* 2013, Krepler, Chunduru *et al.* 2013).

## **7. Caracterització de la mort cel·lular induïda pels *BH3-mimetics***

En aquesta tesi, per tal de poder caracteritzar la influència de cada un dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 en la mort cel·lular induïda per via extrínseca, s'han dissenyat diferents siRNAs específics contra cada un dels membres d'aquesta família. El desenvolupament de siRNAs que puguin bloquejar l'activitat de gens concrets ofereix la possibilitat de desenvolupar una estratègia terapèutica altament específica. Però la teràpia amb siRNAs presenta dificultats: la seva baixa estabilitat en el torrent sanguini, la quantitat de siRNA que penetra dins les cèl·lules és baixa, la generació de respostes no específiques del sistema immune i, de moment, la impossibilitat d'alliberar els siRNAs de forma específica a les cèl·lules tumorals i no les sanes, tot i que possiblement l'ús de la nanotecnologia podrà ser d'utilitat en aquest sentit (Schiffelers, Ansari *et al.* 2004, Li and Huang 2006).

En canvi, la inhibició dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 per mitjà de l'ús dels *BH3-mimetics*, és una estratègia terapèutica per al tractament del càncer que s'està investigant amb força en els últims anys (Marzo and Naval 2008, Frenzel, Grespi *et al.* 2009). Existeixen diversos motius pels quals sembla lògic pensar que la mimetització dels dominis BH3 pugui generar selectivitat contra les cèl·lules cancerígenes. Aquestes, sovint expressen nivells elevats de proteïnes anti-apoptòtiques de la família de Bcl-2 per a evadir la mort cel·lular que s'hauria d'executar en resposta a la proliferació il·limitada, l'activació d'oncogens o el dany en l'ADN (Amundson, Myers *et al.* 2000). A més, les cèl·lules cancerígenes, en comparació amb les cèl·lules normals, són molt més sensibles a la inhibició de proteïnes que promouen la supervivència (Hanahan and Weinberg 2000). Cal tenir present que els dominis BH3 de diferents molècules presenten especificitats d'unió particulars, fet que suggereix la possibilitat de dissenyar *BH3-mimetics* que tinguin com a diana una determinada proteïna que estigui sobre-expressada en un tipus particular de càncer.

Donat que els nostres resultats demostren que la neutralització de la funció de Bcl-x<sub>L</sub> és l'estratègia més efectiva de les emprades per a sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL, i a manca de l'existència d'un inhibidor específic de Bcl-x<sub>L</sub>, vam voler analitzar els efectes sensibilitzadors i / o citotòxics provocats per l'addició al medi de cultiu de diferents *BH3-mimetics*, enlloc de transfectar-les amb l'siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>. Els nostres resultats mostren que alguns *BH3-mimetics*, com per exemple ABT-737, Gossypol i GX15 / Obatoclast, provoquen una citotoxicitat basal a determinades concentracions en les cèl·lules U87MG, que d'altres, com TW-37, no són capaços de generar. La toxicitat induïda per aquestes molècules per si soles podria esdevenir un fet positiu, sempre i quan aquesta toxicitat fos el més específica possible per a les cèl·lules tumorals. Això permetria l'ús d'aquestes molècules com a teràpia única. Un exemple explicat a la introducció és el de l'ABT-737, que és capaç d'induir mort cel·lular de forma efectiva en alguns tumors i causar-ne la regressió en d'altres (Oltersdorf, Elmore *et al.* 2005).

A més a més, hem observat que els diferents *BH3-mimetics*, utilitzats a una mateixa molaritat, generen percentatges de mort cel·lular diferents. Per exemple, en comparar la toxicitat basal generada a 25 µM pels diferents

compostos (30  $\mu$ M en el cas de Gossypol), observem que ABT-737 genera un 99,26 % de citotoxicitat, Gossypol un 3,38 %, GX15 / Obatoclox un 40,19 % i TW-37 un 4,56 %. Així doncs, els nostres resultats mostren que ABT-737 és un citotòxic molt més potent que la resta. Una possible explicació d'aquest fet podria ser que cada compost presenta diferents cinètiques d'unió als membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2, tot i que cal dir que existeix controvèrsia respecte a aquesta qüestió (Taula D1).

Compound	$K_i$ (nM)			
	Bcl-2	Bcl-XL	Mcl-1	Bcl-W
ABT-737	<1	<0.5	ND	ND
ABT-737	120	64	>20 000	24
ABT-263	<1	<0.5	550	<1
TW-37	290	1110	260	ND
TW-37	120	1100	260	ND
Gossypol	ND	500	ND	ND
Gossypol	320	480	180	ND
Gossypol	280	3030	1750	1400
GX15	1110	4690	2000	7010

**Taula D1. Afinitat dels BH3-mimètics pels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2.**

En el cas d'ABT-737, és l'únic compost pel qual està acceptat que inhibeix amb alta afinitat a Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-2, ja que l'afinitat amb la qual uneix a Bcl-w no es coneix amb certesa (Zhai, Jin *et al.* 2006, Bruncko, Oost *et al.* 2007). En el cas de Gossypol, diversos autors coincideixen en que inhibeix amb alta afinitat a Bcl-2 però discrepen en el cas de la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> i Mcl-1 (Kitada, Leone *et al.* 2003, Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006, Zhai, Jin *et al.* 2006). En el cas de GX15 / Obatoclox, s'ha reportat que, tot i unir-se a tots els membres anti-apoptòtics, ho fa amb baixa afinitat (Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006, Zhai, Jin *et al.* 2006). Per últim, en el cas de TW-37 s'ha descrit que inhibeix a Bcl-2 i Mcl-1, amb més afinitat, i Bcl-x<sub>L</sub>, amb menys afinitat (Wang, Nikolovska-Coleska *et al.* 2006) o, segons altres autors, també amb alta afinitat (Verhaegen, Bauer *et al.* 2006). Així doncs, aquestes dades mostren que ABT-737, el BH3-mimètic més citotòxic emprat en aquesta tesi, és l'únic compost pel qual es coneix amb

certesa que inhibeix amb gran especificitat a Bcl-x<sub>L</sub>, així com també a Bcl-2. A més a més, recentment s'ha reportat que el seu efecte citotòxic és degut principalment a la inhibició de Bcl-x<sub>L</sub>. Així, Bcl-x<sub>L</sub> uneix a Bad i controla el balanç entre la seva degradació i la seva síntesi. La inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> causa l'acúmul de Bad al citosol promovent la mort cel·lular (Ezzoukhry, Louandre *et al.* 2011). En conjunt, aquestes dades concorden amb els nostres resultats, relatius als *BH3-mimetics*; però no amb la funció biològica del siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>, ja que de forma basal no indueix citotoxicitat. Així, l'ABT-737, en principi el millor inhibidor de Bcl-x<sub>L</sub> emprat, és capaç d'induir la mort de la cèl·lula de forma basal, a més a més de sensibilitzar a certes concentracions a l'acció citotòxica de TRAIL. D'altra banda, el silenciament d'Smac / DIABLO reverteix tant la mort cel·lular induïda per ABT-737 com per la combinació d'ABT-737 i TRAIL. Aquesta dada, juntament amb els resultats obtinguts amb el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> que demostren que l'efecte sensibilitzador en front a la mort induïda per TRAIL depèn de l'acció pro-apoptòtica d'Smac / DIABLO, fa pensar que l'acció citotòxica principal mitjançada per l'ABT-737 recau en la seva capacitat d'inhibir a Bcl-x<sub>L</sub>. En canvi, la sola inhibició de Bcl-x<sub>L</sub> no explicaria l'efecte citotòxic de l'ABT-737 ja que el silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no indueix mort cel·lular. Per tant, això suggereix que l'ABT-737 podria estar provocant altres efectes col·laterals, nocius per la cèl·lula, no provocats pel silenciament únic de Bcl-x<sub>L</sub>. En qualsevol cas, el que queda clar és Bcl-x<sub>L</sub> es posiciona de nou com una peça clau en el control de la mort cel·lular. Aquestes dades, per tant, reforcen la hipòtesi que cal dissenyar inhibidors potents però encara més específics de la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub>. En aquest sentit, com es discutirà més endavant, s'ha aconseguit sintetitzar una molècula capaç d'inhibir a Bcl-2 però no a Bcl-x<sub>L</sub> (Souers, Levenson *et al.* 2013) i una altra que uneix a Bcl-x<sub>L</sub> amb alta afinitat i de forma específica (Lessene, Czabotar *et al.* 2013) Aquest fet posa de manifest que és possible aconseguir molècules inhibidores dels membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 però que inhibeixin a cada un d'ells de forma individual i selectiva.

Respecte al fenomen de sensibilització, s'ha observat que els *BH3-mimetics* estudiats poden sensibilitzar a la mort induïda per TRAIL. Així, tots els *BH3-mimetics* utilitzats, excepte TW-37, que és l'únic compost que genera uns percentatges de sensibilització equiparables als obtinguts en silenciar Bcl-x<sub>L</sub>,

provoquen una major sensibilització a l'estímul citotòxic de TRAIL comparat amb l'ús del siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>. Això és un fet interessant, ja que l'ús dels *BH3-mimetics* permetria maximitzar els efectes de sensibilització a la mort induïda per TRAIL obtinguts amb l'ús del siRNA contra Bcl-x<sub>L</sub>. Degut a que Smac / DIABLO juga un rol clau en la mort induïda per TRAIL quan els nivells d'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> estan disminuïts, vam voler determinar la rellevància d'Smac / DIABLO en la mort induïda pels *BH3-mimetics*. En primer lloc, si analitzem la citotoxicitat induïda pels *BH3-mimetics* únicament, podem observar que quan són tòxics (ABT-737, Gossypol i GX15 / Obatoclast), la toxicitat és dependent d'Smac / DIABLO. En segon lloc, si analitzem l'acció citotòxica de TRAIL en combinació amb els *BH3-mimetics*, veiem que genera dos tipus de resposta: d'una banda, ABT-737 sensibilitza a l'acció pro-apoptòtica de TRAIL de forma dependent d'Smac / DIABLO; i, d'altra banda, TW-37, Gossypol i GX15 / Obatoclast, sensibilitzen a TRAIL independentment de l'expressió d'Smac / DIABLO. Aquestes últimes dades relatives a la independència de l'acció pro-apoptòtica d'Smac / DIABLO per part d'aquests *BH3-mimetics* en combinació amb TRAIL, suggereix que l'acció conjunta de dos fàrmacs pot induir morts cel·lulars a través de mecanismes diferents als induïts pels fàrmacs de forma individual. Aquest, seria un fet interessant a tenir en compte en el disseny de teràpies combinatòries amb diferents agents ja que el desconeixement de les vies intracel·lulars activades i / o inhibides podria comportar efectes col·laterals indesitjats com, per exemple, un increment de la resistència de les cèl·lules tumorals als fàrmacs emprats o, fins i tot, a nous fàrmacs que utilitzin les mateixes vies intracel·lulars.

## 8. Ús dels *BH3-mimetics* en el tractament del GBM

És important recalcar que, tal i com s'ha dit a la introducció, ABT-737, i la seva forma oral ABT-263, és l'únic *BH3-mimetic* que indueix mort degut a que inhibeix específicament a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w (van Delft, Wei *et al.* 2006, Tse, Shoemaker *et al.* 2008), ja que els altres *BH3-mimetics* poden tenir dianes addicionals que poden causar toxicitat de forma no específica, no prevista i no desitjada. Per això, es fa necessari dissenyar inhibidors més específics (Vogler, Dinsdale *et al.* 2009). Amb aquest objectiu, aquest any s'ha desenvolupat un nou compost que inhibeix selectivament a Bcl-2 sense afectar a Bcl-x<sub>L</sub>, l'ABT-199, el

qual te poca efectivitat en tumors on Bcl-x<sub>L</sub> es troba sobre-expressat (Souers, Levenson *et al.* 2013). Aquestes dades també reforcen els nostres resultats i apunten a una inhibició més específica de Bcl-x<sub>L</sub> per poder sensibilitzar les cèl·lules a la mort induïda pels DRs, al menys en GBMs. De fet, en un estudi recent reporten que s'estan creant nous compostos que inhibeixen a Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-2 amb afinitats d'unió 10.000 vegades més altes que altres compostos dissenyats prèviament, i que són capaços d'inhibir el creixement cel·lular i d'induir citotoxicitat en cèl·lules de carcinoma pulmonar (H146) (Zhou, Chen *et al.* 2012). En un d'aquests estudis, han identificat una molècula petita, el WEHI-539, que uneix a Bcl-x<sub>L</sub> amb alta afinitat i la seva citotoxicitat és deguda al seu efecte antagònic sobre la funció anti-apoptòtica de Bcl-x<sub>L</sub>. (Lessene, Czabotar *et al.* 2013). Aquesta molècula serà una eina de gran utilitat per distingir les funcions de Bcl-x<sub>L</sub> dels altres membres anti-apoptòtics.

D'altra banda, un punt afegit a la inducció de les vies "naturals" de mort cel·lular a partir de l'activació dels DRs com a estratègia terapèutica, és que podríem evitar en gran mesura els efectes col·laterals produïts per l'ús dels fàrmacs convencionals. A més a més, en el cas del GBM, cal tenir en compte que el disseny d'estratègies terapèutiques presenta altres problemes addicionals provocats, en gran part, a la dificultat d'administrar els fàrmacs a les cèl·lules tumorals. Això és degut a la dificultat d'aconseguir que els fàrmacs puguin creuar la barrera hematoencefàlica. En aquest sentit, les noves teràpies que es desenvolupin per al tractament del GBM hauran d'estar relacionades amb mètodes que permetin que els fàrmacs passin a través de la barrera hematoencefàlica i, un cop dins el cervell, puguin accedir a les cèl·lules tumorals. La nanobiotecnologia, i particularment les nanopartícules, estan fent contribucions importants en aquest sentit. Les nanopartícules poden estar compostades de liposomes, micel·les, dendrímers o nanopartícules polimèriques que contindrien els fàrmacs i, gràcies a la seva grandària (100 - 200 nm), podrien creuar la barrera hematoencefàlica per així alliberar els fàrmacs al focus tumoral (Jain 2007, Zhou, Atsina *et al.* 2012).

Així doncs, cal continuar investigant en aquesta línia per desenvolupar compostos, o combinacions d'aquests, que puguin inhibir específicament a una proteïna determinada per tal d'augmentar-ne l'efectivitat. Els nostres resultats

apunten que la combinació del silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, a través de *BH3-mimetics* específics, i l'activació de la via extrínseca de mort cel·lular, i possiblement amb la cooperació d'estratègies nanotecnològiques, podria esdevenir una estratègia anti-cancerígena prometedora en el futur, com a mínim, en el GBM.







*VI.*

## Conclusions



**Primera.** L'expressió forçada del SR-IkBa sensibilitza les cèl·lules HeLa a la mort induïda per TNF $\alpha$ , permetent la senyalització intracel·lular apoptòtica.

**Segona.** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-w, sensibilitza les cèl·lules HeLa a l'apoptosi induïda per l'activació tant de la via extrínseca com de la via intrínseca.

**Tercera.** La mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciada és dependent de caspases i requereix l'activació inicial de caspasa-8.

**Quarta.** La sobre-expressió de Bcl-x<sub>L</sub> evita la mort induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules que sobre-expressen el SR-IkBa.

**Cinquena.** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> sensibilitza les cèl·lules a la mort induïda per TNF $\alpha$  sense afectar l'activitat de NF- $\kappa$ B. Aquest fet es veu corroborat en cèl·lules RD i DU-145.

**Sisena.** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub> no comporta una major sensibilització en front a la citotoxicitat induïda per TNF $\alpha$  en cèl·lules sobre-expressores del SR-IkBa.

**Setena.** Els membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 s'expressen de forma diferencial en les diferents línies cel·lulars analitzades, i Bcl-x<sub>L</sub> és l'únic que es troba expressat de forma ubíqua.

**Vuitena.** Determinades línies cel·lulars són resistents a l'estímul citotòxic de TNF $\alpha$ , fins i tot quan Bcl-x<sub>L</sub> es troba silenciada, com per exemple diverses línies cel·lulars derivades de glioblastoma multiforme (GBM) humana.

**Novena.** Les cèl·lules U87MG derivades de GBM humana expressen els quatre membres anti-apoptòtics principals de la família de Bcl-2.

**Desena.** L'actinomicina D pot sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TNF $\alpha$ , CH11 o TRAIL.

**Onzena.** El silenciament de Bcl-x<sub>L</sub>, però no el de Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, és capaç de sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL, de forma dependent de la mitocondria, i a CH11, de forma independent de la mitocondria.

**Dotzena.** La mort cel·lular induïda per TRAIL en cèl·lules amb Bcl-x<sub>L</sub> silenciada és de tipus apoptòtic, dependent de caspases i requereix la caspasa-8 com a caspasa iniciadora.

**Tretzena.** El silenciament d'Smac / DIABLO rescata l'apoptosi induïda per TRAIL en cèl·lules que tenen silenciada l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub>, malgrat que el citocrom c es troba alliberat al citosol i les caspases es troben aparentment activades.

**Catorzena.** El silenciament de XIAP no és suficient per revertir els efectes de protecció causats pel siRNA contra Smac / DIABLO en cèl·lules U87MG que tenen l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> silenciada i han estat estimulades amb TRAIL.

**Quinzena.** Determinats *BH3-mimetics* són citotòxics de forma basal, com en el cas de ABT-737, Gossypol i GX15 / Obatoclox i, en aquests casos, la toxicitat és dependent d'Smac / DIABLO.

**Setzena.** Els *BH3-mimetics* poden sensibilitzar les cèl·lules U87MG a la mort induïda per TRAIL generant dos tipus de resposta: una independent (TW-37, Gossypol i GX15 / Obatoclox) i l'altre dependent (ABT-737) d'Smac / DIABLO.



*VII.*

Bibliografia







- Aaberg-Jessen, C., A. Norregaard, K. Christensen, C. B. Pedersen, C. Andersen and B. W. Kristensen (2013). "Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures." Int J Clin Exp Pathol **6**(4): 546-560.
- Abhari, B. A., S. Cristofanon, R. Kappler, D. von Schweinitz, R. Humphreys and S. Fulda (2012). "RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization for TRAIL-induced apoptosis via a RIP1/FADD/caspase-8 cell death complex." Oncogene.
- Abrams, P. (2000). "Facts and future lines of research in prostate cancer: concluding remarks." BJU Int **85 Suppl 2**: 49-51.
- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17**(20): 2481-2495.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-1326.
- Adamson, C., O. O. Kanu, A. I. Mehta, C. Di, N. Lin, A. K. Mattox and D. D. Bigner (2009). "Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going." Expert Opin Investig Drugs **18**(8): 1061-1083.
- Adrain, C., E. M. Creagh and S. J. Martin (2001). "Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2." EMBO J **20**(23): 6627-6636.
- Aggarwal, B. B. (2004). "Nuclear factor-kappaB: the enemy within." Cancer Cell **6**(3): 203-208.
- Aggarwal, B. B. and B. Sung (2011). "NF-kappaB in cancer: a matter of life and death." Cancer Discov **1**(6): 469-471.
- Alcantara Llaguno, S., J. Chen, C. H. Kwon, E. L. Jackson, Y. Li, D. K. Burns, A. Alvarez-Buylla and L. F. Parada (2009). "Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model." Cancer Cell **15**(1): 45-56.
- Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak and P. R. Clarke (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol **5**(7): 647-654.
- Allensworth, J. L., S. J. Sauer, H. K. Lyerly, M. A. Morse and G. R. Devi (2013). "Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism." Breast Cancer Res Treat **137**(2): 359-371.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Amundson, S. A., T. G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J. C. Reed and A. J. Fornace, Jr. (2000). "An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines." Cancer Res **60**(21): 6101-6110.

- Arts, H. J., S. de Jong, H. Hollema, K. ten Hoor, A. G. van der Zee and E. G. de Vries (2004). "Chemotherapy induces death receptor 5 in epithelial ovarian carcinoma." Gynecol Oncol **92**(3): 794-800.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-430.
- Ashkenazi, A. (2008). "Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer." Cytokine Growth Factor Rev **19**(3-4): 325-331.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Ashkenazi, A., P. Holland and S. G. Eckhardt (2008). "Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)." J Clin Oncol **26**(21): 3621-3630.
- Bachoo, R. M., E. A. Maher, K. L. Ligon, N. E. Sharpless, S. S. Chan, M. J. You, Y. Tang, J. DeFrances, E. Stover, R. Weissleder, D. H. Rowitch, D. N. Louis and R. A. DePinho (2002). "Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis." Cancer Cell **1**(3): 269-277.
- Baeuerle, P. A. (1998). "IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control." Cell **95**(6): 729-731.
- Baisch, H., U. Otto and G. Kloppel (1990). "Antiproliferative and cytotoxic effects of single and combined treatment with tumor necrosis factor alpha and/or alpha interferon on a human renal cell carcinoma xenotransplanted into nu/nu mice: cell kinetic studies." Cancer Res **50**(19): 6389-6395.
- Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6910-6924.
- Barth, R. F. and B. Kaur (2009). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol **94**(3): 299-312.
- Basseres, D. S. and A. S. Baldwin (2006). "Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression." Oncogene **25**(51): 6817-6830.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-377.
- Baud, V. and M. Karin (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 33-40.
- Bayascas, J. R., V. J. Yuste, E. Benito, J. Garcia-Fernandez and J. X. Comella (2002). "Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Evolutionary considerations for vertebrate caspases." Cell Death Differ **9**(10): 1078-1089.
- Beckman, G., L. Beckman, J. Ponten and B. Westermark (1971). "G-6-PD

- and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells." Hum Hered **21**(3): 238-241.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**(5288): 782-784.
- Beg, A. A., W. C. Sha, R. T. Bronson and D. Baltimore (1995). "Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice." Genes Dev **9**(22): 2736-2746.
- Beinke, S. and S. C. Ley (2004). "Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology." Biochem J **382**(Pt 2): 393-409.
- Bergenheim, T., A. Malmstrom, H. Bolander, A. Michanek, G. Stragliotto, L. Damber, O. Bjor and R. Henriksson (2007). "[Registration on regional basis of patients with primary brain tumors. Regional differences disclosed]." Lakartidningen **104**(5): 332-338, 340-331.
- Bertrand, M. J., S. Milutinovic, K. M. Dickson, W. C. Ho, A. Boudreault, J. Durkin, J. W. Gillard, J. B. Jaquith, S. J. Morris and P. A. Barker (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." Mol Cell **30**(6): 689-700.
- Bharti, A. C. and B. B. Aggarwal (2002). "Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 883-888.
- Bjerkvig, R., A. Tonnesen, O. D. Laerum and E. O. Backlund (1990). "Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture." J Neurosurg **72**(3): 463-475.
- Black, R. A., S. R. Kronheim, J. E. Merriam, C. J. March and T. P. Hopp (1989). "A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta." J Biol Chem **264**(10): 5323-5326.
- Blankenship, J. W., E. Varfolomeev, T. Goncharov, A. V. Fedorova, D. S. Kirkpatrick, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, D. Arnott, M. Aghajan, K. Zobel, J. F. Bazan, W. J. Fairbrother, K. Deshayes and D. Vucic (2009). "Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1)." Biochem J **417**(1): 149-160.
- Boatright, K. M., C. Deis, J. B. Denault, D. P. Sutherlin and G. S. Salvesen (2004). "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)." Biochem J **382**(Pt 2): 651-657.
- Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green and G. S. Salvesen (2003). "A unified model for apical caspase activation." Mol Cell **11**(2): 529-541.
- Borovski, T., E. M. F. De Sousa, L. Vermeulen and J. P. Medema (2011). "Cancer stem cell niche: the place to be." Cancer Res **71**(3): 634-639.
- Bratton, S. B. and G. M. Cohen (2003). "Death receptors leave a caspase footprint that Smacs of XIAP." Cell Death Differ **10**(1): 4-6.

- Bredesen, D. E. (2008). "Programmed cell death mechanisms in neurological disease." Curr Mol Med **8**(3): 173-186.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.
- Brooks, A. D., T. Ramirez, U. Toh, J. Onksen, P. J. Elliott, W. J. Murphy and T. J. Sayers (2005). "The proteasome inhibitor bortezomib (Velcade) sensitizes some human tumor cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1059**: 160-167.
- Bruncko, M., T. K. Oost, B. A. Belli, H. Ding, M. K. Joseph, A. Kunzer, D. Martineau, W. J. McClellan, M. Mitten, S. C. Ng, P. M. Nimmer, T. Oltersdorf, C. M. Park, A. M. Petros, A. R. Shoemaker, X. Song, X. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, S. H. Rosenberg and S. W. Elmore (2007). "Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL." J Med Chem **50**(4): 641-662.
- Budd, R. C., W. C. Yeh and J. Tschopp (2006). "cFLIP regulation of lymphocyte activation and development." Nat Rev Immunol **6**(3): 196-204.
- Burkly, L., C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L. A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate and D. Lo (1995). "Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells." Nature **373**(6514): 531-536.
- Buscaglia, L. E. and Y. Li (2011). "Apoptosis and the target genes of microRNA-21." Chin J Cancer **30**(6): 371-380.
- Caamano, J. H., C. A. Rizzo, S. K. Durham, D. S. Barton, C. Raventos-Suarez, C. M. Snapper and R. Bravo (1998). "Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses." J Exp Med **187**(2): 185-196.
- Cain, K., S. B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D. G. Brown, X. M. Sun and G. M. Cohen (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." J Biol Chem **275**(9): 6067-6070.
- Callus, B. A. and D. L. Vaux (2007). "Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical." Cell Death Differ **14**(1): 73-78.
- Campbell, I. K., S. Gerondakis, K. O'Donnell and I. P. Wicks (2000). "Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis." J Clin Invest **105**(12): 1799-1806.
- Capocaccia, R., G. Gatta, P. Roazzi, E. Carrani, M. Santaquilani, R. De Angelis, A. Tavilla and E. W. Group (2003). "The EURO CARE-3 database: methodology of data collection, standardisation, quality control and statistical analysis." Ann Oncol **14** Suppl 5: v14-27.
- Cartron, P. F., T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F. M. Vallette and P. Juin (2004). "The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA." Mol Cell **16**(5): 807-818.

- Caserta, T. M., A. N. Smith, A. D. Gultice, M. A. Reedy and T. L. Brown (2003). "Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties." Apoptosis **8**(4): 345-352.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong and A. Letai (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-365.
- Chai, J., C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang and Y. Shi (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." Nature **406**(6798): 855-862.
- Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri and Y. Shi (2001). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." Cell **104**(5): 769-780.
- Chao, D. T., G. P. Linette, L. H. Boise, L. S. White, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (1995). "Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death." J Exp Med **182**(3): 821-828.
- Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams and D. C. Huang (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
- Chen, P., A. Rodriguez, R. Erskine, T. Thach and J. M. Abrams (1998). "Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila." Dev Biol **201**(2): 202-216.
- Chen, Z., J. Hagler, V. J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard and T. Maniatis (1995). "Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway." Genes Dev **9**(13): 1586-1597.
- Chen, Z. J. (2005). "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." Nat Cell Biol **7**(8): 758-765.
- Chene, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(2): 102-109.
- Cheung, H. H., D. J. Mahoney, E. C. Lacasse and R. G. Korneluk (2009). "Down-regulation of c-FLIP Enhances death of cancer cells by smac mimetic compound." Cancer Res **69**(19): 7729-7738.
- Chinnaiyan, A. M., U. Prasad, S. Shankar, D. A. Hamstra, M. Shanaiah, T. L. Chenevert, B. D. Ross and A. Rehemtulla (2000). "Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1754-1759.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes and D. R. Green (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." Cell Death Differ **13**(8): 1396-1402.
- Chipuk, J. E., J. C. Fisher, C. P. Dillon, R. W. Kriwacki, T. Kuwana and D. R. Green (2008). "Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20327-20332.

- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" Trends Cell Biol **18**(4): 157-164.
- Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford and F. K. Chan (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-1123.
- Choi, Y. E., M. Butterworth, S. Malladi, C. S. Duckett, G. M. Cohen and S. B. Bratton (2009). "The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing." J Biol Chem **284**(19): 12772-12782.
- Chopra, M., S. S. Riedel, M. Biehl, S. Krieger, V. von Krosigk, C. A. Bauerlein, C. Brede, A. L. Jordan Garrote, S. Kraus, V. Schafer, M. Ritz, K. Mattenheimer, A. Degla, A. Mottok, H. Einsele, H. Wajant and A. Beilhack (2013). "Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis." Carcinogenesis.
- Chowdhury, I., B. Tharakan and G. K. Bhat (2008). "Caspases - an update." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(1): 10-27.
- Chung, T. D., H. J. Mauceri, D. E. Hallahan, J. J. Yu, S. Chung, W. L. Grdina, S. Yajnik, D. W. Kufe and R. R. Weichselbaum (1998). "Tumor necrosis factor-alpha-based gene therapy enhances radiation cytotoxicity in human prostate cancer." Cancer Gene Ther **5**(6): 344-349.
- Churchill, M. E. and M. Suzuki (1989). "'SPKK' motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites." Embo J **8**(13): 4189-4195.
- Ciusani, E., D. Croci, M. Gelati, C. Calatuzzolo, F. Sciacca, L. Fumagalli, M. Balzarotti, L. Fariselli, A. Boiardi and A. Salmaggi (2005). "In vitro effects of topotecan and ionizing radiation on TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis in malignant glioma." J Neurooncol **71**(1): 19-25.
- Clark, M. J., N. Homer, B. D. O'Connor, Z. Chen, A. Eskin, H. Lee, B. Merriman and S. F. Nelson (2010). "U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line." PLoS Genet **6**(1): e1000832.
- Clarke, J., N. Butowski and S. Chang (2010). "Recent advances in therapy for glioblastoma." Arch Neurol **67**(3): 279-283.
- Clarke, P. G. and S. Clarke (1996). "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." Anat Embryol (Berl) **193**(2): 81-99.
- Condorelli, G., G. Vigliotta, A. Cafieri, A. Trencia, P. Andalo, F. Oriente, C. Miele, M. Caruso, P. Formisano and F. Beguinot (1999). "PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis." Oncogene **18**(31): 4409-4415.
- Corazza, N., S. Jakob, C. Schaer, S. Frese, A. Keogh, D. Stroka, D. Kassahn, R. Torgler, C. Mueller, P. Schneider and T. Brunner (2006). "TRAIL receptor-mediated JNK activation and Bim phosphorylation critically regulate Fas-mediated liver



- damage and lethality." J Clin Invest **116**(9): 2493-2499.
- Corsten, M. F., R. Miranda, R. Kasmieh, A. M. Krichevsky, R. Weissleder and K. Shah (2007). "MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas." Cancer Res **67**(19): 8994-9000.
- Cory, S., D. C. Huang and J. M. Adams (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-8607.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-2174.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." Genes Dev **12**(11): 1551-1570.
- Cuconati, A., C. Mukherjee, D. Perez and E. White (2003). "DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells." Genes Dev **17**(23): 2922-2932.
- Cummins, J. M., M. Kohli, C. Rago, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and F. Bunz (2004). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells." Cancer Res **64**(9): 3006-3008.
- Dai, C. and E. C. Holland (2001). "Glioma models." Biochim Biophys Acta **1551**(1): M19-27.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-219.
- Daniels, R. A., H. Turley, F. C. Kimberley, X. S. Liu, J. Mongkolsapaya, P. Ch'En, X. N. Xu, B. Q. Jin, F. Pezzella and G. R. Screaton (2005). "Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues." Cell Res **15**(6): 430-438.
- Daugas, E., D. Nochy, L. Ravagnan, M. Loeffler, S. A. Susin, N. Zamzami and G. Kroemer (2000). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." FEBS Lett **476**(3): 118-123.
- de Vries, N. A., J. H. Beijnen and O. van Tellingen (2009). "High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing." Cancer Treat Rev **35**(8): 714-723.
- de Vries, N. A., S. W. Bruggeman, D. Hulsman, H. I. de Vries, J. Zevenhoven, T. Buckle, B. C. Hamans, W. P. Leenders, J. H. Beijnen, M. van Lohuizen, A. J. Berns and O. van Tellingen (2010). "Rapid and robust transgenic high-grade glioma mouse models for therapy intervention studies." Clin Cancer Res **16**(13): 3431-3441.
- Degterev, A., M. Boyce and J. Yuan (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**(53): 8543-8567.
- Degterev, A., J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X.

- Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy and J. Yuan (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." Nat Chem Biol **4**(5): 313-321.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-390.
- Dell'Albani, P. (2008). "Stem cell markers in gliomas." Neurochem Res **33**(12): 2407-2415.
- Denault, J. B., B. P. Eckelman, H. Shin, C. Pop and G. S. Salvesen (2007). "Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9." Biochem J **405**(1): 11-19.
- Devi, G. R. (2006). "siRNA-based approaches in cancer therapy." Cancer Gene Ther **13**(9): 819-829.
- Devin, A., A. Cook, Y. Lin, Y. Rodriguez, M. Kelliher and Z. Liu (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-429.
- Di Pietro, R., P. Secchiero, R. Rana, D. Gibellini, G. Visani, K. Bemis, L. Zamai, S. Miscia and G. Zauli (2001). "Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1." Blood **97**(9): 2596-2603.
- Ding, J., Z. Zhang, G. J. Roberts, M. Falcone, Y. Miao, Y. Shao, X. C. Zhang, D. W. Andrews and J. Lin (2010). "Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif." J Biol Chem **285**(37): 28749-28763.
- Dinnes, J., C. Cave, S. Huang and R. Milne (2002). "A rapid and systematic review of the effectiveness of temozolomide for the treatment of recurrent malignant glioma." Br J Cancer **86**(4): 501-505.
- Dollbaum, C., A. A. Creasey, S. H. Dairkee, A. J. Hiller, A. R. Rudolph, L. Lin, C. Vitt and H. S. Smith (1988). "Specificity of tumor necrosis factor toxicity for human mammary carcinomas relative to normal mammary epithelium and correlation with response to doxorubicin." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4740-4744.
- Dorr, J., I. Bechmann, S. Waiczies, O. Aktas, H. Walczak, P. H. Krammer, R. Nitsch and F. Zipp (2002). "Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain." J Neurosci **22**(4): RC209.
- Dorstyn, L., P. A. Colussi, L. M. Quinn, H. Richardson and S. Kumar (1999). "DRONC, an ecdysone-inducible Drosophila caspase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4307-4312.
- Drimal, D., J. Drimal and J. Drimal, Jr. (2006). "The regulation of human adrenomedullin (AM) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptors on human epithelial carcinoma (HeLa) cells. The role of AM secretion in tumor cell sensitivity." Neoplasma **53**(2): 144-149.

- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Duiker, E. W., C. H. Mom, S. de Jong, P. H. Willemse, J. A. Gietema, A. G. van der Zee and E. G. de Vries (2006). "The clinical trail of TRAIL." Eur J Cancer **42**(14): 2233-2240.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen and F. L. Scott (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**(10): 988-994.
- Eckhart, L., C. Ballaun, A. Uthman, C. Kittel, M. Stichenwirth, M. Buchberger, H. Fischer, W. Sipos and E. Tschachler (2005). "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity." J Biol Chem **280**(42): 35077-35080.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
- Ekert, P. G., J. Silke, C. J. Hawkins, A. M. Verhagen and D. L. Vaux (2001). "DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9." J Cell Biol **152**(3): 483-490.
- Ekert, P. G., J. Silke and D. L. Vaux (1999). "Caspase inhibitors." Cell Death Differ **6**(11): 1081-1086.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." Cell **44**(6): 817-829.
- Ellis, R. E., D. M. Jacobson and H. R. Horvitz (1991). "Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **129**(1): 79-94.
- Enyedy, I. J., Y. Ling, K. Nacro, Y. Tomita, X. Wu, Y. Cao, R. Guo, B. Li, X. Zhu, Y. Huang, Y. Q. Long, P. P. Roller, D. Yang and S. Wang (2001). "Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening." J Med Chem **44**(25): 4313-4324.
- Eramo, A., L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, L. M. Larocca, C. Peschle and R. De Maria (2006). "Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells." Cell Death Differ **13**(7): 1238-1241.
- Ezzoukhry, Z., C. Louandre, C. Francois, Z. Saidak, C. Godin, J. C. Maziere and A. Galmiche (2011). "The Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetic ABT-737 reveals the dynamic regulation of bad, a proapoptotic protein of the Bcl-2 family, by Bcl-xL." Mol Pharmacol **79**(6): 997-1004.
- Feng, S., Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. E. Zhu, N. Hoti, M. Castanares and M. Wu (2007). "Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain." Cell Signal **19**(10): 2056-2067.
- Fennell, D. A., A. Chacko and L. Mutti (2008). "BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib." Oncogene **27**(9): 1189-1197.
- Feoktistova, M., P. Geserick, B. Kellert, D. P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G.

Hacker and M. Leverkus (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." Mol Cell **43**(3): 449-463.

Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack and E. S. Alnemri (1994). "CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." J Biol Chem **269**(49): 30761-30764.

Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis and P. Vandenabeele (2007). "RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die." Cell Death Differ **14**(3): 400-410.

Fillmore, H. L., J. Shurm, P. Furqueron, S. S. Prabhu, G. T. Gillies and W. C. Broaddus (1999). "An in vivo rat model for visualizing glioma tumor cell invasion using stable persistent expression of the green fluorescent protein." Cancer Lett **141**(1-2): 9-19.

Fischer, H., U. Koenig, L. Eckhart and E. Tschachler (2002). "Human caspase 12 has acquired deleterious mutations." Biochem Biophys Res Commun **293**(2): 722-726.

Fischer, U., R. U. Janicke and K. Schulze-Osthoff (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." Cell Death Differ **10**(1): 76-100.

Flanagan, L., J. Sebastia, L. P. Tuffy, A. Spring, A. Lichawska, M. Devocelle, J. H. Prehn and M. Rehm (2010). "XIAP impairs Smac release from the

mitochondria during apoptosis." Cell Death Dis **1**: e49.

Fletcher, J. I. and D. C. Huang (2008). "Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums." Cell Cycle **7**(1): 39-44.

Frank, S., U. Kohler, G. Schackert and H. K. Schackert (1999). "Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors." Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 454-459.

Franzoso, G., L. Carlson, L. Poljak, E. W. Shores, S. Epstein, A. Leonardi, A. Grinberg, T. Tran, T. Schar-ton-Kersten, M. Anver, P. Love, K. Brown and U. Siebenlist (1998). "Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture." J Exp Med **187**(2): 147-159.

Franzoso, G., L. Carlson, T. Schar-ton-Kersten, E. W. Shores, S. Epstein, A. Grinberg, T. Tran, E. Shacter, A. Leonardi, M. Anver, P. Love, A. Sher and U. Siebenlist (1997). "Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions." Immunity **6**(4): 479-490.

Franzoso, G., L. Carlson, L. Xing, L. Poljak, E. W. Shores, K. D. Brown, A. Leonardi, T. Tran, B. F. Boyce and U. Siebenlist (1997). "Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development." Genes Dev **11**(24): 3482-3496.

Fraser, A. G., N. J. McCarthy and G. I. Evan (1997). "drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells." EMBO J **16**(20): 6192-6199.

- Frenzel, A., F. Grespi, W. Chmielewski and A. Villunger (2009). "Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer." Apoptosis **14**(4): 584-596.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-232.
- Fulda, S., L. Galluzzi and G. Kroemer (2010). "Targeting mitochondria for cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **9**(6): 447-464.
- Gabellini, C., L. Castellini, D. Trisciuglio, M. Kracht, G. Zupi and D. Del Bufalo (2008). "Involvement of nuclear factor-kappa B in bcl-xL-induced interleukin 8 expression in glioblastoma." J Neurochem **107**(3): 871-882.
- Gabriely, G., T. Wurdinger, S. Kesari, C. C. Esau, J. Burchard, P. S. Linsley and A. M. Krichevsky (2008). "MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators." Mol Cell Biol **28**(17): 5369-5380.
- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco and A. Vescevi (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res **64**(19): 7011-7021.
- Galonek, H. L. and J. M. Hardwick (2006). "Upgrading the BCL-2 network." Nat Cell Biol **8**(12): 1317-1319.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leitinger, R. Ruel, D. W. Nicholson and N. A. Thornberry (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." J Biol Chem **273**(49): 32608-32613.
- Garrido, C. and G. Kroemer (2004). "Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 639-646.
- Geserick, P., M. Hupe, M. Moulin, W. W. Wong, M. Feoktistova, B. Kellert, H. Gollnick, J. Silke and M. Leverkus (2009). "Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment." J Cell Biol **187**(7): 1037-1054.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-260.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.
- Gong, B. and A. Almasan (2000). "Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells." Cancer Res **60**(20): 5754-5760.
- Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." Oncogene **29**(34): 4752-4765.
- Gozzelino, R., C. Sole, N. Llecha, M. F. Segura, R. S. Moubarak, V. Iglesias-Guimaraes, M. J. Perez-

Garcia, S. Reix, J. Zhang, N. Badiola, D. Sanchis, J. Rodriguez-Alvarez, R. Trullas, V. J. Yuste and J. X. Comella (2008). "BCL-XL regulates TNF-alpha-mediated cell death independently of NF-kappaB, FLIP and IAPs." Cell Res **18**(10): 1020-1036.

Greco, F. A., P. Bonomi, J. Crawford, K. Kelly, Y. Oh, W. Halpern, L. Lo, G. Gallant and J. Klein (2008). "Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer." Lung Cancer **61**(1): 82-90.

Grell, M., G. Zimmermann, E. Gottfried, C. M. Chen, U. Grunwald, D. C. Huang, Y. H. Wu Lee, H. Durkop, H. Engelmann, P. Scheurich, H. Wajant and A. Strasser (1999). "Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF." EMBO J **18**(11): 3034-3043.

Grimm, S. and M. Notetborn (2010). "Anticancer genes: inducers of tumour-specific cell death signalling." Trends Mol Med **16**(2): 88-96.

Grobben, B., P. P. De Deyn and H. Slegers (2002). "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion." Cell Tissue Res **310**(3): 257-270.

Grossmann, M., D. Metcalf, J. Merryfull, A. Beg, D. Baltimore and S. Gerondakis (1999). "The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11848-11853.

Grumont, R. J., I. J. Rourke, L. A. O'Reilly, A. Strasser, K. Miyake, W. Sha and S. Gerondakis (1998). "B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells." J Exp Med **187**(5): 663-674.

Gugasyan, R., A. Voss, G. Varigos, T. Thomas, R. J. Grumont, P. Kaur, G. Grigoriadis and S. Gerondakis (2004). "The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms." Mol Cell Biol **24**(13): 5733-5745.

Gunther, W., E. Pawlak, R. Damasceno, H. Arnold and A. J. Terzis (2003). "Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids." Br J Cancer **88**(3): 463-469.

Gupta, S. C., C. Sundaram, S. Reuter and B. B. Aggarwal (2010). "Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy." Biochim Biophys Acta **1799**(10-12): 775-787.

Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke and P. Meier (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." Nat Cell Biol **10**(11): 1309-1317.

Hainaut, P. and M. Hollstein (2000). "p53 and human cancer: the first ten

- thousand mutations." Adv Cancer Res **77**: 81-137.
- Hambardzumyan, D., M. Squatrito, E. Carbajal and E. C. Holland (2008). "Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling." Stem Cell Rev **4**(3): 203-210.
- Hambek, M., C. Solbach, H. G. Schnuerch, M. Roller, M. Stegmüller, A. Sterner-Kock, J. Kiefer and R. Knecht (2001). "Tumor necrosis factor alpha sensitizes low epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing carcinomas for anti-EGFR therapy." Cancer Res **61**(3): 1045-1049.
- Han, J., C. Flemington, A. B. Houghton, Z. Gu, G. P. Zambetti, R. J. Lutz, L. Zhu and T. Chittenden (2001). "Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11318-11323.
- Han, L., Y. Zhao and X. Jia (2008). "Mathematical modeling identified c-FLIP as an apoptotic switch in death receptor induced apoptosis." Apoptosis **13**(10): 1198-1204.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hao, Z. and T. W. Mak (2010). "Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP." J Mol Cell Biol **2**(2): 63-64.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao and X. Wang (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." Cell **137**(6): 1100-1111.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2." Cell **76**(4): 665-676.
- Hentze, H., I. Schmitz, M. Latta, A. Krueger, P. H. Krammer and A. Wendel (2002). "Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex." J Biol Chem **277**(7): 5588-5595.
- Hetschko, H., V. Voss, S. Horn, V. Seifert, J. H. Prehn and D. Kogel (2008). "Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma." J Neurooncol **86**(3): 265-272.
- Hinds, M. G., R. S. Norton, D. L. Vaux and C. L. Day (1999). "Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat." Nat Struct Biol **6**(7): 648-651.
- Hockenbery, D., G. Nunez, C. Millman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that

blocks programmed cell death." Nature **348**(6299): 334-336.

Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen and M. Murphy (2002). "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." J Biol Chem **277**(5): 3247-3257.

Hofmann, K. (1999). "The modular nature of apoptotic signaling proteins." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1113-1128.

Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-495.

Horwitz, B. H., M. L. Scott, S. R. Cherry, R. T. Bronson and D. Baltimore (1997). "Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells." Immunity **6**(6): 765-772.

Hossini, A. M. and J. Eberle (2008). "Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain." Biochem Pharmacol **76**(11): 1612-1619.

Hotte, S. J., H. W. Hirte, E. X. Chen, L. L. Siu, L. H. Le, A. Corey, A. Iacobucci, M. MacLean, L. Lo, N. L. Fox and A. M. Oza (2008). "A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies." Clin Cancer Res **14**(11): 3450-3455.

Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson and M. Karin (1999).

"Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase." Science **284**(5412): 316-320.

Hu, Y., L. Ding, D. M. Spencer and G. Nunez (1998). "WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation." J Biol Chem **273**(50): 33489-33494.

Huang, D. C., J. M. Adams and S. Cory (1998). "The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4." EMBO J **17**(4): 1029-1039.

Huang, D. C., S. Cory and A. Strasser (1997). "Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death." Oncogene **14**(4): 405-414.

Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-842.

Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson and T. Hunter (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." J Biol Chem **275**(35): 26661-26664.

Huang, T. T., S. M. Sarkaria, T. F. Cloughesy and P. S. Mischel (2009). "Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead." Neurotherapeutics **6**(3): 500-512.

Huang, Y., Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka and H. Wu (2001). "Structural basis of caspase



- inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." Cell **104**(5): 781-790.
- Huang, Y., R. L. Rich, D. G. Myszka and H. Wu (2003). "Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac." J Biol Chem **278**(49): 49517-49522.
- Hunter, A. M., D. Kottachchi, J. Lewis, C. S. Duckett, R. G. Korneluk and P. Liston (2003). "A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO." J Biol Chem **278**(9): 7494-7499.
- Hutchins, J. B. and S. W. Barger (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." Anat Rec **253**(3): 79-90.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-288.
- Iotsova, V., J. Caamano, J. Loy, Y. Yang, A. Lewin and R. Bravo (1997). "Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2." Nat Med **3**(11): 1285-1289.
- Irmiler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French and J. Tschopp (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-195.
- Ishida, M., M. Sunamura, T. Furukawa, L. P. Lefter, R. Morita, M. Akada, S. Egawa, M. Unno and A. Horii (2008). "The PMAIP1 gene on chromosome 18 is a candidate tumor suppressor gene in human pancreatic cancer." Dig Dis Sci **53**(9): 2576-2582.
- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-354.
- Jain, K. K. (2007). "Use of nanoparticles for drug delivery in glioblastoma multiforme." Expert Rev Neurother **7**(4): 363-372.
- Jain, R. K. (1999). "Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors." Annu Rev Biomed Eng **1**: 241-263.
- Jain, R. K. (2001). "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 149-168.
- Jain, R. K., E. di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen and T. T. Batchelor (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nat Rev Neurosci **8**(8): 610-622.
- Janicke, R. U., P. Ng, M. L. Sprengart and A. G. Porter (1998). "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis." J Biol Chem **273**(25): 15540-15545.
- Janssens, S., A. Tinel, S. Lippens and J. Tschopp (2005). "PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage." Cell **123**(6): 1079-1092.
- Jeffers, J. R., E. Parganas, Y. Lee, C. Yang, J. Wang, J. Brennan, K. H. MacLean, J. Han, T. Chittenden, J. N. Ihle, P. J. McKinnon, J. L. Cleveland and G. P. Zambetti (2003). "Puma is

an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways." Cancer Cell **4**(4): 321-328.

Jhaveri, K. A., V. Ramkumar, R. A. Trammell and L. A. Toth (2006). "Spontaneous, homeostatic, and inflammation-induced sleep in NF-kappaB p50 knockout mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **291**(5): R1516-1526.

Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2006). "Distinct signaling pathways in TRAIL-versus tumor necrosis factor-induced apoptosis." Mol Cell Biol **26**(21): 8136-8148.

Johnstone, R. W., A. A. Ruefli and S. W. Lowe (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." Cell **108**(2): 153-164.

Jost, P. J., S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser and T. Kaufmann (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." Nature **460**(7258): 1035-1039.

Joza, N., G. Kroemer and J. M. Penninger (2002). "Genetic analysis of the mammalian cell death machinery." Trends Genet **18**(3): 142-149.

Kalanxhi, E. and C. J. Wallace (2007). "Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models." Biochem J **407**(2): 179-187.

Kamba, T. and D. M. McDonald (2007). "Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for

cancer." Br J Cancer **96**(12): 1788-1795.

Kang, T. B., G. S. Oh, E. Scandella, B. Bolinger, B. Ludewig, A. Kovalenko and D. Wallach (2008). "Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice." J Immunol **181**(4): 2522-2532.

Kantari, C. and H. Walczak (2011). "Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 558-563.

Kastamoulas, M., G. Chondrogiannis, P. Kanavaros, G. Vartholomatos, M. Bai, E. Briasoulis, D. Arvanitis and V. Galani (2013). "Cytokine effects on cell survival and death of A549 lung carcinoma cells." Cytokine **61**(3): 816-825.

Kato, T., Jr., M. Delhase, A. Hoffmann and M. Karin (2003). "CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response." Mol Cell **12**(4): 829-839.

Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol **8**(8): 324-330.

Kerr, J. F., B. Harmon and J. Searle (1974). "An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers." J Cell Sci **14**(3): 571-585.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic

- biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, H. E., F. Du, M. Fang and X. Wang (2005). "Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17545-17550.
- Kim, J. J. and I. F. Tannock (2005). "Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure." Nat Rev Cancer **5**(7): 516-525.
- Kim, M. R., J. Y. Lee, M. T. Park, Y. J. Chun, Y. J. Jang, C. M. Kang, H. S. Kim, C. K. Cho, Y. S. Lee, H. Y. Jeong and S. J. Lee (2001). "Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells." FEBS Lett **505**(1): 179-184.
- Kim, S., H. Takahashi, W. W. Lin, P. Descargues, S. Grivennikov, Y. Kim, J. L. Luo and M. Karin (2009). "Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis." Nature **457**(7225): 102-106.
- Kitada, S., M. Leone, S. Sareth, D. Zhai, J. C. Reed and M. Pellecchia (2003). "Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins." J Med Chem **46**(20): 4259-4264.
- Klement, J. F., N. R. Rice, B. D. Car, S. J. Abbondanzo, G. D. Powers, P. H. Bhatt, C. H. Chen, C. A. Rosen and C. L. Stewart (1996). "IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice." Mol Cell Biol **16**(5): 2341-2349.
- Knight, M. J., C. D. Riffkin, A. M. Muscat, D. M. Ashley and C. J. Hawkins (2001). "Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells." Oncogene **20**(41): 5789-5798.
- Koenig, U., L. Eckhart and E. Tschachler (2001). "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1150-1154.
- Kondo, S., Y. Shinomura, Y. Miyazaki, T. Kiyohara, S. Tsutsui, S. Kitamura, Y. Nagasawa, M. Nakahara, S. Kanayama and Y. Matsuzawa (2000). "Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers." Cancer Res **60**(16): 4328-4330.
- Kontgen, F., R. J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, R. Li, D. Tarlinton and S. Gerondakis (1995). "Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression." Genes Dev **9**(16): 1965-1977.
- Koschny, R., T. M. Ganten, J. Sykora, T. L. Haas, M. R. Sprick, A. Kolb, W. Stremmel and H. Walczak (2007). "TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window." Hepatology **45**(3): 649-658.
- Koschny, R., H. Holland, J. Sykora, T. L. Haas, M. R. Sprick, T. M. Ganten, W. Krupp, M. Bauer, P. Ahnert, J. Meixensberger and H. Walczak (2007). "Bortezomib sensitizes primary

human astrocytoma cells of WHO grades I to IV for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis." Clin Cancer Res **13**(11): 3403-3412.

Kostura, M. J., M. J. Tocci, G. Limjuco, J. Chin, P. Cameron, A. G. Hillman, N. A. Chartrain and J. A. Schmidt (1989). "Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5227-5231.

Krepler, C., S. K. Chunduru, M. B. Halloran, X. He, M. Xiao, A. Vultur, J. Villanueva, Y. Mitsuuchi, E. M. Neiman, C. Benetatos, K. L. Nathanson, R. K. Amaravadi, H. Pehamberger, M. McKinlay and M. Herlyn (2013). "The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells." Clin Cancer Res **19**(7): 1784-1794.

Kreuzaler, P. and C. J. Watson (2012). "Killing a cancer: what are the alternatives?" Nat Rev Cancer **12**(6): 411-424.

Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer and S. Kirchhoff (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." J Biol Chem **276**(23): 20633-20640.

Kumamoto, H. and K. Ooya (2005). "Expression of tumor necrosis factor alpha, TNF-related apoptosis-inducing

ligand, and their associated molecules in ameloblastomas." J Oral Pathol Med **34**(5): 287-294.

Kuper, H., H. O. Adami and D. Trichopoulos (2000). "Infections as a major preventable cause of human cancer." J Intern Med **248**(3): 171-183.

Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." Mol Cell **17**(4): 525-535.

Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-342.

Kvansakul, M., H. Yang, W. D. Fairlie, P. E. Czabotar, S. F. Fischer, M. A. Perugini, D. C. Huang and P. M. Colman (2008). "Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands." Cell Death Differ **15**(10): 1564-1571.

Kwon, C. H., D. Zhao, J. Chen, S. Alcantara, Y. Li, D. K. Burns, R. P. Mason, E. Y. Lee, H. Wu and L. F. Parada (2008). "Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas." Cancer Res **68**(9): 3286-3294.

Labbe, K. and M. Saleh (2008). "Cell death in the host response to

- infection." Cell Death Differ **15**(9): 1339-1349.
- Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens and P. Vandenabeele (2002). "Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man." Cell Death Differ **9**(4): 358-361.
- Lavrik, I. N., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-2672.
- Le Bras, M., I. Rouy and C. Brenner (2006). "The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis." Med Chem **2**(1): 1-12.
- Lefranc, F., J. Brotchi and R. Kiss (2005). "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis." J Clin Oncol **23**(10): 2411-2422.
- Leist, M., F. Gantner, I. Bohlinger, P. G. Germann, G. Tiegs and A. Wendel (1994). "Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest." J Immunol **153**(4): 1778-1788.
- Lessene, G., P. E. Czabotar, B. E. Sleebs, K. Zobel, K. N. Lowes, J. M. Adams, J. B. Baell, P. M. Colman, K. Deshayes, W. J. Fairbrother, J. A. Flygare, P. Gibbons, W. J. Kersten, S. Kulasegaram, R. M. Moss, J. P. Parisot, B. J. Smith, I. P. Street, H. Yang, D. C. Huang and K. G. Watson (2013). "Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor." Nat Chem Biol **9**(6): 390-397.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler and S. J. Korsmeyer (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-192.
- Levy, Y. S., Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed and D. Offen (2005). "Therapeutic potential of neurotrophic factors in neurodegenerative diseases." BioDrugs **19**(2): 97-127.
- Li, J. and J. Yuan (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." Oncogene **27**(48): 6194-6206.
- Li, K., Y. Li, J. M. Shelton, J. A. Richardson, E. Spencer, Z. J. Chen, X. Wang and R. S. Williams (2000). "Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis." Cell **101**(4): 389-399.
- Li, Q., G. Estepa, S. Memet, A. Israel and I. M. Verma (2000). "Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation." Genes Dev **14**(14): 1729-1733.
- Li, Q., D. Van Antwerp, F. Mercurio, K. F. Lee and I. M. Verma (1999). "Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene." Science **284**(5412): 321-325.
- Li, S. D. and L. Huang (2006). "Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells." Mol Pharm **3**(5): 579-588.
- Li, Z. W., S. A. Omori, T. Labuda, M. Karin and R. C. Rickert (2003). "IKK

beta is required for peripheral B cell survival and proliferation." J Immunol **170**(9): 4630-4637.

Lin, Y., L. Bai, W. Chen and S. Xu (2010). "The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy." Expert Opin Ther Targets **14**(1): 45-55.

Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez and Z. G. Liu (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." Genes Dev **13**(19): 2514-2526.

Liu, Z., C. Sun, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J. C. Wu and S. W. Fesik (2000). "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain." Nature **408**(6815): 1004-1008.

Lockshin, R. A. (1969). "Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein." J Insect Physiol **15**(9): 1505-1516.

Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths." J Insect Physiol **11**(7): 831-844.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-550.

Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.

Lopez, H., L. Zhang, N. M. George, X. Liu, X. Pang, J. J. Evans, N. M. Targy and X. Luo (2010). "Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage." J Biol Chem **285**(20): 15016-15026.

Lu, Z. Y., S. P. Yu, J. F. Wei and L. Wei (2006). "Age-related neural degeneration in nuclear-factor kappaB p50 knockout mice." Neuroscience **139**(3): 965-978.

Luque, I. and C. Gelinas (1998). "Distinct domains of IkappaBalpha regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus." Mol Cell Biol **18**(3): 1213-1224.

Luthi, A. U. and S. J. Martin (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." Cell Death Differ **14**(4): 641-650.

Mace, P. D., K. Linke, R. Feltham, F. R. Schumacher, C. A. Smith, D. L. Vaux, J. Silke and C. L. Day (2008). "Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment." J Biol Chem **283**(46): 31633-31640.

MacEwan, D. J. (2002). "TNF ligands and receptors--a matter of life and death." Br J Pharmacol **135**(4): 855-875.

MacEwan, D. J. (2002). "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences." Cell Signal **14**(6): 477-492.

Machein, M. R. and K. H. Plate (2004). "Role of VEGF in developmental angiogenesis and in tumor

- angiogenesis in the brain." Cancer Treat Res **117**: 191-218.
- Makris, C., V. L. Godfrey, G. Krahn-Senftleben, T. Takahashi, J. L. Roberts, T. Schwarz, L. Feng, R. S. Johnson and M. Karin (2000). "Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti." Mol Cell **5**(6): 969-979.
- Mani, A. and E. P. Gelmann (2005). "The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer." J Clin Oncol **23**(21): 4776-4789.
- Mantovani, A. (2009). "Cancer: Inflaming metastasis." Nature **457**(7225): 36-37.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.
- Marini, P. (2006). "Drug evaluation: lexatumumab, an intravenous human agonistic mAb targeting TRAIL receptor 2." Curr Opin Mol Ther **8**(6): 539-546.
- Marques-Fernandez, F., L. Planells-Ferrer, R. Gozzelino, K. M. Galenkamp, S. Reix, N. Llecha-Cano, J. Lopez-Soriano, V. J. Yuste, R. S. Moubarak and J. X. Comella (2013). "TNFalpha induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway." Cell Death Dis **4**: e493.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.
- Martins, L. M., I. Iaccarino, T. Tenev, S. Gschmeissner, N. F. Totty, N. R. Lemoine, J. Savopoulos, C. W. Gray, C. L. Creasy, C. Dingwall and J. Downward (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif." J Biol Chem **277**(1): 439-444.
- Martins, L. M., A. Morrison, K. Klupsch, V. Fedele, N. Moiso, P. Teismann, A. Abuin, E. Grau, M. Geppert, G. P. Livi, C. L. Creasy, A. Martin, I. Hargreaves, S. J. Heales, H. Okada, S. Brandner, J. B. Schulz, T. Mak and J. Downward (2004). "Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice." Mol Cell Biol **24**(22): 9848-9862.
- Marzo, I. and J. Naval (2008). "Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy." Biochem Pharmacol **76**(8): 939-946.
- Mayer, A., W. Neupert and R. Lill (1995). "Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria." J Biol Chem **270**(21): 12390-12397.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2002). "The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network." Trends Biochem Sci **27**(9): 462-467.
- McCarthy, M. M., K. A. DiVito, M. Sznol, D. Kovacs, R. Halaban, A. J. Berger, K. T. Flaherty, R. L. Camp, R. Lazova, D. L. Rimm and H. M. Kluger (2006). "Expression of tumor necrosis factor--related apoptosis-inducing ligand receptors 1 and 2 in melanoma." Clin Cancer Res **12**(12): 3856-3863.

- McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn and S. J. Korsmeyer (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." Cell **57**(1): 79-88.
- McStay, G. P., G. S. Salvesen and D. R. Green (2008). "Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways." Cell Death Differ **15**(2): 322-331.
- Meier, P., A. Finch and G. Evan (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.
- Melloni, E., P. Secchiero, C. Celeghini, D. Campioni, V. Grill, L. Guidotti and G. Zauli (2005). "Functional expression of TRAIL and TRAIL-R2 during human megakaryocytic development." J Cell Physiol **204**(3): 975-982.
- Memet, S., D. Laouini, J. C. Epinat, S. T. Whiteside, B. Goudeau, D. Philpott, S. Kayal, P. J. Sansonetti, P. Berche, J. Kanellopoulos and A. Israel (1999). "IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis." J Immunol **163**(11): 5994-6005.
- Merino, D., M. Giam, P. D. Hughes, O. M. Siggs, K. Heger, L. A. O'Reilly, J. M. Adams, A. Strasser, E. F. Lee, W. D. Fairlie and P. Bouillet (2009). "The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins." J Cell Biol **186**(3): 355-362.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand and M. G. Grutter (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." J Biol Chem **277**(47): 45162-45171.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.
- Mirimanoff, R. O. (2008). "Concurrent chemoradiotherapy for malignant glioma: dead end or highway?" Onkologie **31**(8-9): 430-431.
- Mittl, P. R., S. Di Marco, J. F. Krebs, X. Bai, D. S. Karanewsky, J. P. Priestle, K. J. Tomaselli and M. G. Grutter (1997). "Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone." J Biol Chem **272**(10): 6539-6547.
- Munoz-Pinedo, C., A. Guio-Carrion, J. C. Goldstein, P. Fitzgerald, D. D. Newmeyer and D. R. Green (2006). "Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11573-11578.
- Mutch, D. G., C. B. Powell, M. S. Kao and J. L. Collins (1992). "Resistance to cytolysis by tumor necrosis factor alpha in malignant gynecological cell lines is associated with the expression of protein(s) that prevent the activation of phospholipase A2 by tumor necrosis factor alpha." Cancer Res **52**(4): 866-872.
- Nagai, S., K. Washiyama, M. Kurimoto, A. Takaku, S. Endo and T. Kumanishi (2002). "Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human



- malignant astrocytoma." J Neurosurg **96**(5): 909-917.
- Nagane, M., W. K. Cavenee and Y. Shiokawa (2007). "Synergistic cytotoxicity through the activation of multiple apoptosis pathways in human glioma cells induced by combined treatment with ionizing radiation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." J Neurosurg **106**(3): 407-416.
- Nagane, M., G. Pan, J. J. Weddle, V. M. Dixit, W. K. Cavenee and H. J. Huang (2000). "Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo." Cancer Res **60**(4): 847-853.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-365.
- Nakanishi, C. and M. Toi (2005). "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs." Nat Rev Cancer **5**(4): 297-309.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-694.
- Nguyen, M., R. C. Marcellus, A. Roulston, M. Watson, L. Serfass, S. R. Murthy Madiraju, D. Goulet, J. Viallet, L. Belec, X. Billot, S. Acoca, E. Purisima, A. Wiegman, L. Cluse, R. W. Johnstone, P. Beaulant and G. C. Shore (2007). "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19512-19517.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-1042.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik and et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." Nature **376**(6535): 37-43.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." Cell Signal **14**(5): 381-395.
- Nijhawan, D., M. Fang, E. Traer, Q. Zhong, W. Gao, F. Du and X. Wang (2003). "Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation." Genes Dev **17**(12): 1475-1486.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary and M. Tessier-Lavigne (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." Nature **457**(7232): 981-989.
- Oeckinghaus, A., M. S. Hayden and S. Ghosh (2011). "Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways." Nat Immunol **12**(8): 695-708.
- Ogden, A. T., A. E. Waziri, R. A. Lochhead, D. Fusco, K. Lopez, J. A. Ellis, J. Kang, M. Assanah, G. M. McKhann, M. B. Sisti, P. C. McCormick, P. Canoll and J. N. Bruce

(2008). "Identification of A2B5+CD133-tumor-initiating cells in adult human gliomas." Neurosurgery **62**(2): 505-514; discussion 514-505.

Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lutolf and P. Kleihues (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.

Okada, H., W. K. Suh, J. Jin, M. Woo, C. Du, A. Elia, G. S. Duncan, A. Wakeham, A. Itie, S. W. Lowe, X. Wang and T. W. Mak (2002). "Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice." Mol Cell Biol **22**(10): 3509-3517.

Okada, S., Y. Urakami, T. Kato, M. Tsuji and R. Inoue (1992). "The Rolandic mu rhythm: a clinical study of the atypical group." Clin Electroencephalogr **23**(1): 10-18.

Oki, Y., A. Copeland, F. Hagemester, L. E. Fayad, M. Fanale, J. Romaguera and A. Younes (2012). "Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma." Blood **119**(9): 2171-2172.

Oltersdorf, T., S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J.

Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik and S. H. Rosenberg (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." Nature **435**(7042): 677-681.

Opferman, J. T., A. Letai, C. Beard, M. D. Sorcinelli, C. C. Ong and S. J. Korsmeyer (2003). "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." Nature **426**(6967): 671-676.

Orlowski, R. Z. and A. S. Baldwin, Jr. (2002). "NF-kappaB as a therapeutic target in cancer." Trends Mol Med **8**(8): 385-389.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-6866.

Pan, G., J. H. Bauer, V. Haridas, S. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B. B. Aggarwal, J. Ni and V. M. Dixit (1998). "Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor." FEBS Lett **431**(3): 351-356.

Panichakul, T., T. Wanun, V. Reutrakul and S. Sirisinha (2002). "Synergistic cytotoxicity and apoptosis induced in human cholangiocarcinoma cell lines by a combined treatment with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and triptolide." Asian Pac J Allergy Immunol **20**(3): 167-173.

Panner, A., A. T. Parsa and R. O. Pieper (2006). "Use of APO2L/TRAIL with mTOR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme." Expert Rev Anticancer Ther **6**(9): 1313-1322.

- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**(5897): 1807-1812.
- Pasparakis, M., T. Luedde and M. Schmidt-Supprian (2006). "Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice." Cell Death Differ **13**(5): 861-872.
- Pereira, N. A. and Z. Song (2008). "Some commonly used caspase substrates and inhibitors lack the specificity required to monitor individual caspase activity." Biochem Biophys Res Commun **377**(3): 873-877.
- Peter, M. E., R. C. Budd, J. Desbarats, S. M. Hedrick, A. O. Hueber, M. K. Newell, L. B. Owen, R. M. Pope, J. Tschoop, H. Wajant, D. Wallach, R. H. Wiltrott, M. Zornig and D. H. Lynch (2007). "The CD95 receptor: apoptosis revisited." Cell **129**(3): 447-450.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ **10**(1): 26-35.
- Petersen, S. L., M. Peyton, J. D. Minna and X. Wang (2010). "Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11936-11941.
- Petersen, S. L., L. Wang, A. Yalcin-Chin, L. Li, M. Peyton, J. Minna, P. Harran and X. Wang (2007). "Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis." Cancer Cell **12**(5): 445-456.
- Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." Exp Cell Res **316**(8): 1324-1331.
- Piippo, M., N. Lietzen, O. S. Nevalainen, J. Salmi and T. A. Nyman (2010). "Pripper: prediction of caspase cleavage sites from whole proteomes." BMC Bioinformatics **11**: 320.
- Pistrutto, G., M. Jost, S. M. Srinivasula, R. Baffa, J. L. Poyet, C. Kari, Y. Lazebnik, U. Rodeck and E. S. Alnemri (2002). "Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia." Cell Death Differ **9**(9): 995-1006.
- Pobezinskaya, Y. L., Y. S. Kim, S. Choksi, M. J. Morgan, T. Li, C. Liu and Z. Liu (2008). "The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors." Nat Immunol **9**(9): 1047-1054.
- Podechard, N., V. Lecureur, E. Le Ferrec, I. Guenon, L. Sparfel, D. Gilot, J. R. Gordon, V. Lagente and O. Fardel (2008). "Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation." Toxicol Lett **177**(2): 130-137.
- Pohl, T., R. Gugasyan, R. J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, D. Tarlinton, W. Sha, D. Baltimore and S.

Gerondakis (2002). "The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4514-4519.

Ponassi, R., B. Biasotti, V. Tomati, S. Bruno, A. Poggi, D. Malacarne, G. Cimoli, A. Salis, S. Pozzi, M. Miglino, G. Damonte, P. Cozzini, F. Spyrikis, B. Campanini, L. Bagnasco, N. Castagnino, L. Tortolina, A. Mumot, F. Frassoni, A. Daga, M. Cilli, F. Piccardi, I. Monfardini, M. Perugini, G. Zoppoli, C. D'Arrigo, R. Pesenti and S. Parodi (2008). "A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor: biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex-vivo anti-leukemic activity." Cell Cycle **7**(20): 3211-3224.

Pop, C., P. Fitzgerald, D. R. Green and G. S. Salvesen (2007). "Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization." Biochemistry **46**(14): 4398-4407.

Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-21781.

Qin, H., S. M. Srinivasula, G. Wu, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri and Y. Shi (1999). "Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1." Nature **399**(6736): 549-557.

Qiu, W., H. Liu, A. Sebastini, Q. Sun, H. Wang, L. Zhang and J. Yu (2013). "An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression." Oncogene **32**(19): 2380-2389.

Quintana, E., M. Shackleton, M. S. Sabel, D. R. Fullen, T. M. Johnson and S. J. Morrison (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222): 593-598.

Quintavalle, C., E. Donnarumma, M. Iaboni, G. Roscigno, M. Garofalo, G. Romano, D. Fiore, P. De Marinis, C. M. Croce and G. Condorelli (2012). "Effect of miR-21 and miR-30b/c on TRAIL-induced apoptosis in glioma cells." Oncogene.

Ramp, U., E. Caliskan, C. Mahotka, A. Krieg, S. Heikaus, H. E. Gabbert and C. D. Gerharz (2003). "Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage." Br J Cancer **88**(11): 1800-1807.

Rampino, N., H. Yamamoto, Y. Ionov, Y. Li, H. Sawai, J. C. Reed and M. Perucho (1997). "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype." Science **275**(5302): 967-969.

Rano, T. A., T. Timkey, E. P. Peterson, J. Rotonda, D. W. Nicholson, J. W. Becker, K. T. Chapman and N. A. Thornberry (1997). "A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE)." Chem Biol **4**(2): 149-155.

Rayet, B. and C. Gelinis (1999). "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer." Oncogene **18**(49): 6938-6947.

Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins." Oncogene **17**(25): 3225-3236.

- Reed, J. C. (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer." J Clin Oncol **17**(9): 2941-2953.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 111-121.
- Ren, Y., X. Zhou, M. Mei, X. B. Yuan, L. Han, G. X. Wang, Z. F. Jia, P. Xu, P. Y. Pu and C. S. Kang (2010). "MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol." BMC Cancer **10**: 27.
- Ricci, M. S. and W. X. Zong (2006). "Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways." Oncologist **11**(4): 342-357.
- Riedl, S. J., W. Li, Y. Chao, R. Schwarzenbacher and Y. Shi (2005). "Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP." Nature **434**(7035): 926-933.
- Riedl, S. J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington and G. S. Salvesen (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." Cell **104**(5): 791-800.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 405-413.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Roberts, D. L., I. S. Goping and R. C. Bleackley (2003). "Mitochondria at the heart of the cytotoxic attack." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 513-518.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." Genes Dev **13**(24): 3179-3184.
- Rodriguez, M. S., J. Wright, J. Thompson, D. Thomas, F. Baleux, J. L. Virelizier, R. T. Hay and F. Arenzana-Seisdedos (1996). "Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I kappa B-alpha in vivo." Oncogene **12**(11): 2425-2435.
- Rohn, T. A., B. Wagenknecht, W. Roth, U. Naumann, E. Gulbins, P. H. Krammer, H. Walczak and M. Weller (2001). "CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release." Oncogene **20**(31): 4128-4137.
- Ross, A. J., K. G. Waymire, J. E. Moss, A. F. Parlow, M. K. Skinner, L. D. Russell and G. R. MacGregor (1998). "Testicular degeneration in Bclw-deficient mice." Nat Genet **18**(3): 251-256.
- Rotonda, J., D. W. Nicholson, K. M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E. P. Peterson, D. M. Rasper, R. Ruel, J. P. Vaillancourt, N. A. Thornberry and J. W. Becker (1996). "The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis." Nat Struct Biol **3**(7): 619-625.
- Rudolph, D., W. C. Yeh, A. Wakeham, B. Rudolph, D. Nallainathan, J. Potter, A. J. Elia and T. W. Mak (2000).

"Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice." Genes Dev **14**(7): 854-862.

Ruggieri, P., G. Mangino, B. Fioretti, L. Catacuzzeno, R. Puca, D. Ponti, M. Miscusi, F. Franciolini, G. Ragona and A. Calogero (2012). "The inhibition of KCa3.1 channels activity reduces cell motility in glioblastoma derived cancer stem cells." PLoS One **7**(10): e47825.

Saito, R., J. R. Bringas, A. Panner, M. Tamas, R. O. Pieper, M. S. Berger and K. S. Bankiewicz (2004). "Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model." Cancer Res **64**(19): 6858-6862.

Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel and E. S. Alnemri (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." J Biol Chem **274**(25): 17941-17945.

Saleh, M., J. P. Vaillancourt, R. K. Graham, M. Huyck, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, M. H. Steinberg, V. Nolan, C. T. Baldwin, R. S. Hotchkiss, T. G. Buchman, B. A. Zehnbaauer, M. R. Hayden, L. A. Farrer, S. Roy and D. W. Nicholson (2004). "Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms." Nature **429**(6987): 75-79.

Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." Cell **91**(4): 443-446.

Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-10967.

Saunders, J. W., Jr. (1966). "Death in embryonic systems." Science **154**(3749): 604-612.

Schiffelers, R. M., A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria and M. C. Woodle (2004). "Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle." Nucleic Acids Res **32**(19): e149.

Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez and H. Steller (2008). "Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity." Genes Dev **22**(16): 2256-2266.

Schimmer, A. D. (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice." Cancer Res **64**(20): 7183-7190.

Schutze, S., V. Tchikov and W. Schneider-Brachert (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 655-662.

Schwartzbaum, J. A., J. L. Fisher, K. D. Aldape and M. Wrensch (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." Nat Clin Pract Neurol **2**(9): 494-503; quiz 491 p following 516.

Schwarz, E. M., P. Krimpenfort, A. Berns and I. M. Verma (1997). "Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3." Genes Dev **11**(2): 187-197.

- Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S. A. Oakes, C. A. Mannella and S. J. Korsmeyer (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis." Dev Cell **2**(1): 55-67.
- Scott, F. L., J. B. Denault, S. J. Riedl, H. Shin, M. Renatus and G. S. Salvesen (2005). "XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs." EMBO J **24**(3): 645-655.
- Secchiero, P., E. Melloni, M. Heikinheimo, S. Mannisto, R. Di Pietro, A. Iacone and G. Zauli (2004). "TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway." Blood **103**(2): 517-522.
- Seo, N., S. Hayakawa and Y. Tokura (2002). "Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells." Semin Cancer Biol **12**(4): 291-300.
- Seth, S., R. Johns and M. V. Templin (2012). "Delivery and biodistribution of siRNA for cancer therapy: challenges and future prospects." Ther Deliv **3**(2): 245-261.
- Sha, W. C., H. C. Liou, E. I. Tuomanen and D. Baltimore (1995). "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." Cell **80**(2): 321-330.
- Shi, Y. (2001). "A structural view of mitochondria-mediated apoptosis." Nat Struct Biol **8**(5): 394-401.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-470.
- Shih, V. F., R. Tsui, A. Caldwell and A. Hoffmann (2011). "A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling." Cell Res **21**(1): 86-102.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman and Y. Shi (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." Mol Cell **11**(2): 519-527.
- Shiozaki, E. N. and Y. Shi (2004). "Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology." Trends Biochem Sci **29**(9): 486-494.
- Shore, G. C. and J. Viallet (2005). "Modulating the bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 226-230.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Sidiropoulos, P. I., G. Goulielmos, G. K. Voloudakis, E. Petraki and D. T. Boumpas (2008). "Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts." Ann Rheum Dis **67**(10): 1382-1389.
- Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang and D. L. Vaux (2005). "Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance."

Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16182-16187.

Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.

Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.

Skalka, M., J. Matyasova and M. Cejkova (1976). "Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments." FEBS Lett **72**(2): 271-274.

Smith, C. A. (1994). "Dis-attachment." Aust N Z J Psychiatry **28**(4): 691-693.

Snell, V., K. Clodi, S. Zhao, R. Goodwin, E. K. Thomas, S. W. Morris, M. E. Kadin, F. Cabanillas, M. Andreeff and A. Younes (1997). "Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies." Br J Haematol **99**(3): 618-624.

Sole, C., X. Dolcet, M. F. Segura, H. Gutierrez, M. T. Diaz-Meco, R. Gozzelino, D. Sanchis, J. R. Bayascas, C. Gallego, J. Moscat, A. M. Davies and J. X. Comella (2004). "The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling." J Cell Biol **167**(3): 479-492.

Song, J., H. Tan, H. Shen, K. Mahmood, S. E. Boyd, G. I. Webb, T.

Akutsu and J. C. Whisstock (2010). "Cascleave: towards more accurate prediction of caspase substrate cleavage sites." Bioinformatics **26**(6): 752-760.

Song, J. H., D. K. Song, B. Pyrzynska, K. C. Petruk, E. G. Van Meir and C. Hao (2003). "TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways." Brain Pathol **13**(4): 539-553.

Song, Z., K. McCall and H. Steller (1997). "DCP-1, a Drosophila cell death protease essential for development." Science **275**(5299): 536-540.

Sorenson, C. M. (2004). "Bcl-2 family members and disease." Biochim Biophys Acta **1644**(2-3): 169-177.

Souers, A. J., J. D. Levenson, E. R. Boghaert, S. L. Ackler, N. D. Catron, J. Chen, B. D. Dayton, H. Ding, S. H. Enschede, W. J. Fairbrother, D. C. Huang, S. G. Hymowitz, S. Jin, S. L. Khaw, P. J. Kovar, L. T. Lam, J. Lee, H. L. Maecker, K. C. Marsh, K. D. Mason, M. J. Mitten, P. M. Nimmer, A. Oleksijew, C. H. Park, C. M. Park, D. C. Phillips, A. W. Roberts, D. Sampath, J. F. Seymour, M. L. Smith, G. M. Sullivan, S. K. Tahir, C. Tse, M. D. Wendt, Y. Xiao, J. C. Xue, H. Zhang, R. A. Humerickhouse, S. H. Rosenberg and S. W. Elmore (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." Nat Med **19**(2): 202-208.

Spierings, D., G. McStay, M. Saleh, C. Bender, J. Chipuk, U. Maurer and D. R. Green (2005). "Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial



pathway of apoptosis." Science **310**(5745): 66-67.

Spierings, D. C., E. G. de Vries, E. Vellenga, F. A. van den Heuvel, J. J. Koornstra, J. Wesseling, H. Hollema and S. de Jong (2004). "Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors." J Histochem Cytochem **52**(6): 821-831.

Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." Mol Cell **1**(7): 949-957.

Srinivasula, S. M., P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang and E. S. Alnemri (2000). "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway." J Biol Chem **275**(46): 36152-36157.

Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.

Stander, S. and T. Schwarz (2005). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer." Am J Dermatopathol **27**(2): 116-121.

Stennicke, H. R., M. Renatus, M. Meldal and G. S. Salvesen (2000). "Internally quenched fluorescent

peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8." Biochem J **350 Pt 2**: 563-568.

Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1999). "Catalytic properties of the caspases." Cell Death Differ **6**(11): 1054-1059.

Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.

Strater, J., U. Hinz, H. Walczak, G. Mechtersheimer, K. Koretz, C. Herfarth, P. Moller and T. Lehnert (2002). "Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter." Clin Cancer Res **8**(12): 3734-3740.

Stummer, W., H. J. Reulen, T. Meinel, U. Pichlmeier, W. Schumacher, J. C. Tonn, V. Rohde, F. Oettel, B. Turowski, C. Woiciechowsky, K. Franz, T. Pietsch and A. L.-G. S. Group (2008). "Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias." Neurosurgery **62**(3): 564-576; discussion 564-576.

Stupp, R. and D. C. Weber (2005). "The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma." Onkologie **28**(6-7): 315-317.

Sudheerkumar, P., A. Shiras, G. Das, J. C. Jagtap, V. Prasad and P. Shastry (2008). "Independent activation of Akt and NF-kappaB pathways and their role in resistance to TNF-alpha mediated cytotoxicity in gliomas." Mol Carcinog **47**(2): 126-136.

- Sun, C., M. Cai, R. P. Meadows, N. Xu, A. H. Gunasekera, J. Herrmann, J. C. Wu and S. W. Fesik (2000). "NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP." J Biol Chem **275**(43): 33777-33781.
- Suzuki, M., R. J. Youle and N. Tjandra (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-654.
- Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-621.
- Symons, A., S. Beinke and S. C. Ley (2006). "MAP kinase kinase kinases and innate immunity." Trends Immunol **27**(1): 40-48.
- Tachias, K. and E. L. Madison (1996). "Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen." J Biol Chem **271**(46): 28749-28752.
- Tagscherer, K. E., A. Fassl, B. Campos, M. Farhadi, A. Kraemer, B. C. Bock, S. Macher-Goepfing, B. Radlwimmer, O. D. Wiestler, C. Herold-Mende and W. Roth (2008). "Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins." Oncogene **27**(52): 6646-6656.
- Takeda, K., O. Takeuchi, T. Tsujimura, S. Itami, O. Adachi, T. Kawai, H. Sanjo, K. Yoshikawa, N. Terada and S. Akira (1999). "Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK $\alpha$ ." Science **284**(5412): 313-316.
- Tamm, I. (2008). "AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer." Curr Opin Investig Drugs **9**(6): 638-646.
- Tang, G., K. Ding, Z. Nikolovska-Coleska, C. Y. Yang, S. Qiu, S. Shangary, R. Wang, J. Guo, W. Gao, J. Meagher, J. Stuckey, K. Krajewski, S. Jiang, P. P. Roller and S. Wang (2007). "Structure-based design of flavonoid compounds as a new class of small-molecule inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins." J Med Chem **50**(14): 3163-3166.
- Tartaglia, L. A., C. J. Gimeno, G. Storz and B. N. Ames (1992). "Multidegenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator." J Biol Chem **267**(3): 2038-2045.
- Tata, J. R. (1966). "Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture." Dev Biol **13**(1): 77-94.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.
- Tenev, T., K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain and P. Meier (2011). "The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs." Mol Cell **43**(3): 432-448.
- Tergaonkar, V., V. Bottero, M. Ikawa, Q. Li and I. M. Verma (2003). "IkappaB kinase-independent IkappaB $\alpha$  degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for

- cancer therapy." Mol Cell Biol **23**(22): 8070-8083.
- Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (1995). "Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase." Cell **81**(5): 801-809.
- Thomas, R., J. M. Frentz, E. Harmon and G. D. Frentz (1992). "Effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on renal function and body height in pediatric patients." J Urol **148**(3 Pt 2): 1064-1066.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-1462.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." Br Med Bull **53**(3): 478-490.
- Thornberry, N. A. (1998). "Caspases: key mediators of apoptosis." Chem Biol **5**(5): R97-103.
- Tinel, A., S. Janssens, S. Lippens, S. Cuenin, E. Logette, B. Jaccard, M. Quadroni and J. Tschopp (2007). "Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway." EMBO J **26**(1): 197-208.
- Tolcher, A. W., M. Mita, N. J. Meropol, M. von Mehren, A. Patnaik, K. Padavic, M. Hill, T. Mays, T. McCoy, N. L. Fox, W. Halpern, A. Corey and R. B. Cohen (2007). "Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1." J Clin Oncol **25**(11): 1390-1395.
- Trehin, R., J. L. Figueiredo, M. J. Pittet, R. Weissleder, L. Josephson and U. Mahmood (2006). "Fluorescent nanoparticle uptake for brain tumor visualization." Neoplasia **8**(4): 302-311.
- Tse, C., A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S. K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S. H. Rosenberg and S. W. Elmore (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." Cancer Res **68**(9): 3421-3428.
- Twiddy, D. and K. Cain (2007). "Caspase-9 cleavage, do you need it?" Biochem J **405**(1): e1-2.
- Tzung, S. P., K. M. Kim, G. Basanez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K. Y. Zhang and D. M. Hockenbery (2001). "Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3." Nat Cell Biol **3**(2): 183-191.
- Ueda, S., H. Nakamura, H. Masutani, T. Sasada, S. Yonehara, A. Takabayashi, Y. Yamaoka and J. Yodoi (1998). "Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c." J Immunol **161**(12): 6689-6695.
- Uhrbom, L., E. Nerio and E. C. Holland (2004). "Dissecting tumor maintenance requirements using bioluminescence imaging of cell proliferation in a mouse

glioma model." Nat Med **10**(11): 1257-1260.

Uren, A. G., K. O'Rourke, L. A. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." Mol Cell **6**(4): 961-967.

Uren, R. T., G. Dewson, L. Chen, S. C. Coyne, D. C. Huang, J. M. Adams and R. M. Kluck (2007). "Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak." J Cell Biol **177**(2): 277-287.

Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, T. Kafri, D. R. Green and I. M. Verma (1996). "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB." Science **274**(5288): 787-789.

Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." Anat Histol Embryol **31**(4): 214-223.

van Delft, M. F., A. H. Wei, K. D. Mason, C. J. Vandenberg, L. Chen, P. E. Czabotar, S. N. Willis, C. L. Scott, C. L. Day, S. Cory, J. M. Adams, A. W. Roberts and D. C. Huang (2006). "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." Cancer Cell **10**(5): 389-399.

van Geelen, C. M., J. L. Westra, E. G. de Vries, W. Boersma-van Ek, N. Zwart, H. Hollema, H. M. Boezen, N. H. Mulder, J. T. Plukker, S. de Jong, J. H. Kleibeuker and J. J. Koornstra

(2006). "Prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in adjuvantly treated stage III colon cancer patients." J Clin Oncol **24**(31): 4998-5004.

van Ijken, M. G., B. van Etten, J. H. de Wilt, S. T. van Tiel, T. L. ten Hagen and A. M. Eggermont (2000). "Tumor necrosis factor-alpha augments tumor effects in isolated hepatic perfusion with melphalan in a rat sarcoma model." J Immunother **23**(4): 449-455.

Vande Walle, L., M. Lamkanfi and P. Vandenabeele (2008). "The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview." Cell Death Differ **15**(3): 453-460.

Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit and D. Vucic (2007). "IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 669-681.

Varfolomeev, E., H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic and A. Ashkenazi (2005). "Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." J Biol Chem **280**(49): 40599-40608.

Varfolomeev, E. and D. Vucic (2008). "(Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways." Cell Cycle **7**(11): 1511-1521.

- Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" Cell **116**(4): 491-497.
- Vaux, D. L. (2011). "Apoptogenic factors released from mitochondria." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 546-550.
- Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-442.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- Verhaegen, M., J. A. Bauer, C. Martin de la Vega, G. Wang, K. G. Wolter, J. C. Brenner, Z. Nikolovska-Coleska, A. Bengtson, R. Nair, J. T. Elder, M. Van Brocklin, T. E. Carey, C. R. Bradford, S. Wang and M. S. Soengas (2006). "A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species." Cancer Res **66**(23): 11348-11359.
- Verhagen, A. M., E. J. Coulson and D. L. Vaux (2001). "Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs." Genome Biol **2**(7): REVIEWS3009.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Verhagen, A. M., T. K. Kratina, C. J. Hawkins, J. Silke, P. G. Ekert and D. L. Vaux (2007). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." Cell Death Differ **14**(2): 348-357.
- Vescovi, A. L., R. Galli and B. A. Reynolds (2006). "Brain tumour stem cells." Nat Rev Cancer **6**(6): 425-436.
- Viatour, P., M. P. Merville, V. Bours and A. Chariot (2005). "Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation." Trends Biochem Sci **30**(1): 43-52.
- Villunger, A., E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams and A. Strasser (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-1038.
- Vogler, M., D. Dinsdale, M. J. Dyer and G. M. Cohen (2009). "Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy." Cell Death Differ **16**(3): 360-367.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Vucic, D. and W. J. Fairbrother (2007). "The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer." Clin Cancer Res **13**(20): 5995-6000.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis

factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Walker, P. R., J. Leblanc, C. Carson, M. Ribocco and M. Sikorska (1999). "Neither caspase-3 nor DNA fragmentation factor is required for high molecular weight DNA degradation in apoptosis." Ann N Y Acad Sci **887**: 48-59.

Wallner, K. E., J. H. Galicich, G. Krol, E. Arbit and M. G. Malkin (1989). "Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **16**(6): 1405-1409.

Wang, C. Y., M. W. Mayo and A. S. Baldwin, Jr. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." Science **274**(5288): 784-787.

Wang, G., Z. Nikolovska-Coleska, C. Y. Yang, R. Wang, G. Tang, J. Guo, S. Shangary, S. Qiu, W. Gao, D. Yang, J. Meagher, J. Stuckey, K. Krajewski, S. Jiang, P. P. Roller, H. O. Abaan, Y. Tomita and S. Wang (2006). "Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins." J Med Chem **49**(21): 6139-6142.

Wang, J., A. A. Lobito, F. Shen, F. Hornung, A. Winoto and M. J. Lenardo (2000). "Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP." Eur J Immunol **30**(1): 155-163.

Wang, L., F. Du and X. Wang (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.

Wang, L., M. Miura, L. Bergeron, H. Zhu and J. Yuan (1994). "Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death." Cell **78**(5): 739-750.

Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**(22): 2922-2933.

Wang, X. W. (1999). "Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis." Anticancer Res **19**(6A): 4759-4771.

Wei, M. C., T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**(16): 2060-2071.

Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.

Weih, F., D. Carrasco, S. K. Durham, D. S. Barton, C. A. Rizzo, R. P. Ryseck, S. A. Lira and R. Bravo (1995). "Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family." Cell **80**(2): 331-340.

Weih, F., S. K. Durham, D. S. Barton, W. C. Sha, D. Baltimore and R. Bravo (1997). "p50-NF-kappaB complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice." J Exp Med **185**(7): 1359-1370.

- Weng, C., Y. Li, D. Xu, Y. Shi and H. Tang (2005). "Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells." J Biol Chem **280**(11): 10491-10500.
- Wild-Bode, C., M. Weller, A. Rimner, J. Dichgans and W. Wick (2001). "Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma." Cancer Res **61**(6): 2744-2750.
- Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-625.
- Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams and D. C. Huang (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." Genes Dev **19**(11): 1294-1305.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, T. Kaufmann, M. F. van Delft, L. Chen, P. E. Czabotar, H. Ierino, E. F. Lee, W. D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R. M. Kluck, J. M. Adams and D. C. Huang (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-859.
- Wilson, K. P., J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck and et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." Nature **370**(6487): 270-275.
- Wilson, N. S., V. Dixit and A. Ashkenazi (2009). "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks." Nat Immunol **10**(4): 348-355.
- Wolf, K. and P. Friedl (2006). "Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity." Br J Dermatol **154 Suppl 1**: 11-15.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res **30**: 87.
- Wu, C. J., D. B. Conze, T. Li, S. M. Srinivasula and J. D. Ashwell (2006). "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." Nat Cell Biol **8**(4): 398-406.
- Wu, G., J. Chai, T. L. Suber, J. W. Wu, C. Du, X. Wang and Y. Shi (2000). "Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO." Nature **408**(6815): 1008-1012.
- Wu, W., P. Liu and J. Li (2012). "Necroptosis: an emerging form of programmed cell death." Crit Rev Oncol Hematol **82**(3): 249-258.
- Wu, Y., J. W. Mehew, C. A. Heckman, M. Arcinas and L. M. Boxer (2001). "Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells." Oncogene **20**(2): 240-251.
- Wu, Z. H., A. Mabb and S. Miyamoto (2005). "PIDD: a switch hitter." Cell **123**(6): 980-982.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith and D. Dunlop (1984). "Chromatin

cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." J Pathol **142**(1): 67-77.

Yakovlev, A. G., S. M. Knoblach, L. Fan, G. B. Fox, R. Goodnight and A. I. Faden (1997). "Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury." J Neurosci **17**(19): 7415-7424.

Yamada, K. M. and M. Araki (2001). "Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2375-2382.

Yamada, T., H. Ohyama, Y. Kinjo and M. Watanabe (1981). "Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro." Radiat Res **85**(3): 544-553.

Yan, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein and D. D. Bigner (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." N Engl J Med **360**(8): 765-773.

Yang, L., Z. Cao, H. Yan and W. C. Wood (2003). "Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy." Cancer Res **63**(20): 6815-6824.

Yang, L., K. Lindholm, Y. Konishi, R. Li and Y. Shen (2002). "Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and

survival through different signal transduction pathways." J Neurosci **22**(8): 3025-3032.

Yang, Q. H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M. L. Newton and C. Du (2003). "Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis." Genes Dev **17**(12): 1487-1496.

Yaoita, H., K. Ogawa, K. Maehara and Y. Maruyama (1998). "Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor." Circulation **97**(3): 276-281.

Yeretssian, G., K. Doiron, W. Shao, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, D. W. Nicholson and M. Saleh (2009). "Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(22): 9016-9020.

Yin, C., C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer and T. Van Dyke (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." Nature **385**(6617): 637-640.

Yoshikawa, M., M. Toyohara, S. Ueda, A. Shiroy, H. Takeuchi, T. Nishiyama, T. Yamada, H. Fukui and S. Ishizaka (1999). "Glycyrrhizin inhibits TNF-induced, but not Fas-mediated, apoptosis in the human hepatoblastoma line HepG2." Biol Pharm Bull **22**(9): 951-955.

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.



- Yu, J., L. Zhang, P. M. Hwang, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." Mol Cell **7**(3): 673-682.
- Yuste, V. J., I. Sanchez-Lopez, C. Sole, M. Encinas, J. R. Bayascas, J. Boix and J. X. Comella (2002). "The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells." J Neurochem **80**(1): 126-139.
- Zarnegar, B. J., Y. Wang, D. J. Mahoney, P. W. Dempsey, H. H. Cheung, J. He, T. Shiba, X. Yang, W. C. Yeh, T. W. Mak, R. G. Korneluk and G. Cheng (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." Nat Immunol **9**(12): 1371-1378.
- Zhai, D., C. Jin, A. C. Satterthwait and J. C. Reed (2006). "Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins." Cell Death Differ **13**(8): 1419-1421.
- Zhang, D., C. Lu, M. Whiteman, B. Chance and J. S. Armstrong (2008). "The mitochondrial permeability transition regulates cytochrome c release for apoptosis during endoplasmic reticulum stress by remodeling the cristae junction." J Biol Chem **283**(6): 3476-3486.
- Zhang, L., H. Lopez, N. M. George, X. Liu, X. Pang and X. Luo (2011). "Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways." Cell Death Differ **18**(5): 864-873.
- Zheng, L., N. Bidere, D. Staudt, A. Cubre, J. Orenstein, F. K. Chan and M. Lenardo (2006). "Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1." Mol Cell Biol **26**(9): 3505-3513.
- Zhivotovsky, B. D., N. B. Zvonareva and K. P. Hanson (1981). "Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body x-irradiation." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **39**(4): 437-440.
- Zhou, H., J. Chen, J. L. Meagher, C. Y. Yang, A. Aguilar, L. Liu, L. Bai, X. Cong, Q. Cai, X. Fang, J. A. Stuckey and S. Wang (2012). "Design of Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors with subnanomolar binding affinities based upon a new scaffold." J Med Chem **55**(10): 4664-4682.
- Zhou, J., K. B. Atsina, B. T. Himes, G. W. Strohbehn and W. M. Saltzman (2012). "Novel delivery strategies for glioblastoma." Cancer J **18**(1): 89-99.
- Zhou, Q., P. Fukushima, W. DeGraff, J. B. Mitchell, M. Stetler Stevenson, A. Ashkenazi and P. S. Steeg (2000). "Radiation and the Apo2L/TRAIL apoptotic pathway preferentially inhibit the colonization of premalignant human breast cells overexpressing cyclin D1." Cancer Res **60**(10): 2611-2615.
- Zhou, X., Y. Ren, L. Moore, M. Mei, Y. You, P. Xu, B. Wang, G. Wang, Z. Jia, P. Pu, W. Zhang and C. Kang (2010). "Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status." Lab Invest **90**(2): 144-155.

Zimmermann, K. C., C. Bonzon and D. R. Green (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-413.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang (1999). "An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-11556.

Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli and R. C. Armstrong (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." J Biol Chem **278**(10): 8091-8098.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurlé (2002). "Programmed cell death in the developing limb." Int J Dev Biol **46**(7): 871-876.

*VIII.*

## Annex

Publicacions relacionades amb aquesta tesi

Currículum vitae abreujat