



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

**Estudi d'un procés de mort cel·lular  
induït per una activació no canònica de les  
caspases caracteritzat per la presència  
de morfologies necròtiques**

**Tesi Doctoral**

**Maria Mercè Garcia i Belinchón**

**Bellaterra, 2013**





Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

**Estudi d'un procés de mort cel·lular  
induït per una activació no canònica de les  
caspases caracteritzat per la presència  
de morfologies necròtiques**

Memòria de la Tesi Doctoral presentada per **Maria Mercè Garcia i Belinchón** per optar al **Grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina** 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 del Dr. Víctor J. Yuste Mateos.

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

Bellaterra, 31 d'octubre del 2013

Doctoranda

Maria Mercè Garcia i Belinchón

Director de Tesi

Víctor J. Yuste Mateos



*Cap al cel, al meu pare i als meus abuelitos*

*A la meva estimada mama*

*A tots els meus germans: Maria, Carme i Manel*

*A tu, Guillem*



# I. ÍNDEX







<b>I. ÍNDIX</b> .....	1
<b>II. RESUM</b> .....	9
<b>III. INTRODUCCIÓ</b> .....	13
<b>1. El concepte “apoptosi”: origen i rellevància biològica</b> .....	15
<b>2. Classificacions dels processos de mort cel·lular</b> .....	23
<b>2.1. Primera classificació: tipus de mort segons les característiques morfològiques cel·lulars</b> .....	23
2.1.1. Mort de tipus 1 o “apoptosi”.....	23
2.1.2. Mort de tipus 2 o “mort autofàgica”.....	25
2.1.3. Mort de tipus 3 o “degradació vesicular no lisosomal”.....	25
<b>2.2. Evolució del concepte PCD</b> .....	25
2.2.1. Tipus de mort PCD segons la morfologia del nucli.....	26
2.2.1.A. Apoptosi clàssica.....	26
2.2.1.B. <i>Apoptosis-like</i> PCD.....	26
2.2.1.C. <i>Necrosi-like</i> PCD.....	27
2.2.2. Tipus de mort cel·lular no PCD: necrosi accidental.....	27
<b>2.3. Última classificació: recomanacions del Comitè de Nomenclatura en Mort Cel·lular (NCCD)</b> .....	28
2.3.1. Tipus de mort acceptats per la NCCD.....	28
2.3.2. L’apoptosi.....	33
2.3.2.A. La mitocòndria com a orgànul clau durant l’apoptosi.....	36
2.3.2.B. Senyals apoptòtiques intrínseques.....	39
2.3.2.B.1 Estrès oxidatiu.....	39
2.3.2.B.1.1. Generalitats.....	39
2.3.2.B.1.2. Citotoxicitat cel·lular: oxidació de proteïnes, lípids i ADN.....	40
2.3.2.B.1.3. Mecanismes d’activació de la via intrínseca per ROS.....	42
2.3.2.B.1.4. Processos de detoxificació cel·lular.....	42
2.3.2.B.2. Dany genotòxic per agents intercalants.....	45

2.3.2.B.3. Altres induccions de mort per via mitocondrial: l'estaurosporina com a estímul intrínsec.....	47
2.3.2.C. Proteïnes de la família BCL-2 i regulació de la permeabilització mitocondrial.....	47
2.3.2.D. Alliberament de factors mitocondrials pro-apotogènics.....	50
2.3.2.E. Estratègies terapèutiques en la via intrínseca: BH3 mimètics.....	52
2.3.2.E.1. Queleritrina.....	53
2.3.3. La necrosi.....	54
2.3.3.A. Generalitats.....	54
2.3.3.B. Necroptosi.....	55
<b>3. Bioquímica de l'apoptosi: les caspases.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Antecedents moleculars de l'apoptosi en el model cel·lular de <i>Caenorhabditis     elegans</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2. Propietats moleculars de les caspases: organització estructural.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. Tipus i criteris de classificació.....</b>	<b>61</b>
3.3.1. Especificitat proteolítica.....	61
3.3.2. Llargada del pro-domini.....	62
3.3.3. Funcionalitat.....	63
<b>3.4. Mecanismes d'activació.....</b>	<b>64</b>
3.4.1. Caspases iniciadores: activació per dimerització.....	64
3.4.2. Caspases executores: activació per escissió.....	65
3.4.3. Maduració proteolítica.....	65
<b>3.5. Substractes cel·lulars de les caspases.....</b>	<b>66</b>
<b>3.6. Regulació de l'activitat de les caspases.....</b>	<b>68</b>
3.6.1. Inhibidors endògens.....	68
3.6.2. Inhibidors químics.....	69
3.6.3. Inhibició per ROS.....	70
<b>4. Degradació de l'ADN durant l'apoptosi.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Tipus de fragmentació i canvis nuclears.....</b>	<b>71</b>

<b>4.2. Endonucleases implicades en la fragmentació de l'ADN</b> .....	71
4.2.1. Tipus d'endonucleases.....	71
4.2.2. L'endonucleasa DFF40/CAD/CPAN.....	74
4.2.2.A. Descobriment de CAD i el seu inhibidor DFF45/ICAD.....	74
4.2.2.B. Requeriments bioquímics i estructurals per l'activitat de CAD.....	76
4.2.2.C. Localització cel·lular i estat d'oligomerització del complex ICAD-CAD.....	79
4.2.2.D. Expressió i funció de les isoformes d'ICAD: ICAD-S i ICAD-L.....	81
<b>IV. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	83
<b>V. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	87
<b>1. Cultius cel·lulars</b> .....	89
<b>2. Transfecció cel·lular</b> .....	89
<b>3. Assajos de viabilitat cel·lular</b> .....	89
<b>3.1. Assaig de supervivència: MTT</b> .....	89
<b>3.2. Assajos de mort cel·lular: alliberament de LDH extracel·lular i doble tinció nuclear de PI i Hoechst 33342</b> .....	90
<b>4. Anàlisi de morfologia nuclear</b> .....	91
4.1. Tinció nuclear amb Hoechst 33258.....	91
4.2. Microscopia electrònica.....	91
<b>5. Anàlisi de degradació de l'ADN</b> .....	91
5.1. Fragmentació d'alt pes molecular de l'ADN (HMW, <i>High Molecular Weight</i> ).....	91
5.2. Fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (LMW, <i>Low Molecular Weight</i> ).....	92
<b>6. Extraccions de proteïna i Western Blot</b> .....	93
<b>7. Anàlisi d'activitat de caspases: assaig d'activitat DEVDasa</b> .....	95
<b>8. Subfraccionament cel·lulars</b> .....	95
8.1. Subfraccionament citoplasmàtic.....	95
8.2. Subfraccionament nuclear.....	95
<b>9. Detecció de les espècies reactives de l'oxigen (ROS)</b> .....	96

<b>VI. RESULTATS</b> .....	97
1. Queleritrina indueix una mort cel·lular de forma homogènia en absència del fenotip nuclear apoptòtic en les cèl·lules SH-SY5Y.....	99
2. Tots els BH3 mimètics utilitzats, a excepció de queleritrina, indueixen una mort cel·lular caracteritzada per la presència de morfologies nuclears apoptòtiques en les cèl·lules SH-SY5Y.....	101
3. Queleritrina tampoc provoca l'aparició de nuclis apoptòtics en altres línies cel·lulars humanes derivades de neuroblastoma.....	103
4. Queleritrina indueix la hidròlisi de l'ADN en fragments d'alt pes molecular però no en fragments oligonucleosomals.....	105
5. La mort cel·lular induïda per la queleritrina és ràpida i sincrònica.....	108
6. Queleritrina provoca l'activació de les caspases i l'alliberament de factors pro-apoptogènics mitocondrials cap al citosol.....	111
7. La mort cel·lular induïda per queleritrina és dependent de l'activació de les caspases.....	113
8. Queleritrina és capaç d'induir mort cel·lular en cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores de la proteïna antiapoptòtica Bcl-X <sub>L</sub> .....	115
9. Queleritrina indueix una activació prematura de les caspases.....	117
10. ICAD és processat correctament després del tractament amb queleritrina.....	120
11. La sobreexpressió d'ICAD-L no permet recuperar la morfologia nuclear apoptòtica després del tractament amb queleritrina.....	121
12. La sobreexpressió de l'endonucleasa CAD no restableix el fenotip apoptòtic després del tractament amb queleritrina.....	123
13. La sobreexpressió de CAD en cèl·lules IMR-5 tampoc és capaç de recuperar la morfologia nuclear apoptòtica ni la degradació oligonucleosomal de l'ADN després de sotmetre les cèl·lules a l'insult citotòxic de queleritrina.....	125
14. Els nivells d'expressió de CAD no es veuen alterats durant el tractament amb queleritrina.....	127
15. El pre-tractament d'estaurosporina no és capaç de revertir el fenotip de mort induït per queleritrina cap a un procés de mort apoptòtic.....	129
16. Queleritrina impedeix el fenotip apoptòtic induït per estaurosporina manifestant el seu efecte intercalant sobre l'ADN.....	130

---

17. El fenotip apoptòtic provocat per l'estaurosporina s'inhibeix en presència de compostos amb propietats d'unió a l'ADN.....	135
18. Tant l'addició d'antioxidants tiòlics com la d'un inhibidor de la necroptosi al medi de cultiu, eviten la mort cel·lular induïda per queleritrina.....	137
19. L'addició de queleritrina al medi de cultiu provoca un increment intracel·lular d'espècies reactives de l'oxigen.....	142
20. El fenotip de mort induït per la queleritrina varia segons la concentració d'antioxidant tiòlic present al medi de cultiu.....	143
<b>VII. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>151</b>
1. Rellevància de l'estudi de nous processos de mort cel·lulars en cèl·lules malignes: caracterització del model de mort induït per queleritrina.....	153
2. Estudi de les causes de l'activació prematura de les caspases en la manifestació d'un fenotip de mort necròtic.....	155
3. Implicació del sistema ICAD·CAD en el fenotip de mort induït per queleritrina.....	161
4. Interès terapèutic dels BH3 mimètics: queleritrina com a una estratègia d'estudi de processos de mort amb dianes addicionals?.....	169
5. Conseqüències biològiques del fenotip de mort.....	171
<b>VIII. CONCLUSIONS.....</b>	<b>175</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>179</b>
<b>X. ANNEXE: CONTRIBUCIONS CIENTÍFIQUES.....</b>	<b>204</b>



## **II. RESUM**







La definició clàssica de la mort apoptòtica estableix la presència d'una morfologia nuclear apoptòtica de tipus II (condensació de la cromatina i fragmentació del nucli) i la degradació oligonucleosomal de l'ADN o LMW (*low molecular weight*). Les cèl·lules derivades de neuroblastoma humà SH-SY5Y presenten aquest fenotip de mort després de ser sotmeses a un estímul citotòxic com, per exemple, l'estaurosporina. En aquest treball demostrem que les cèl·lules SH-SY5Y pateixen un procés de mort cel·lular de forma homogènia amb un fenotip nuclear no apoptòtic després de ser tractades amb l'alcaloide pertanyent a la família de les benzofenantridines, queleritrina. Aquest fenotip nuclear no apoptòtic també és observat en altres línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà després de ser tractades amb queleritrina. A més, establim que aquest alcaloide tampoc és capaç d'induir la degradació oligonucleosomal de l'ADN, inclús quan s'estan assolint percentatges de mort més elevats que en el tractament amb estaurosporina. Per altra banda, demostrem que la manifestació del fenotip nuclear no apoptòtic succeeix de forma primerenca i depenent de l'activació anticipada de les caspases, en un procés de mort cel·lular que es desencadena ràpidament. En aquest context, l'increment d'expressió dels nivells de CAD, la principal endonucleasa responsable de la degradació apoptòtica de l'ADN i de la morfologia nuclear de tipus II, no restableix el fenotip apoptòtic en les cèl·lules tractades amb queleritrina. A més, demostrem que les cèl·lules SH-SY5Y manifesten el fenotip de mort no apoptòtic induït per l'alcaloide malgrat CAD es trobi a la fracció cromatínica. Per altra banda, establim que el procés de mort cel·lular induït per queleritrina coincideix amb la manifestació de les propietats intercalants d'aquest alcaloide sobre l'ADN. En aquest aspecte, mostrem que altres agents d'unió a l'ADN, a l'igual que queleritrina, impedeixen la manifestació del fenotip apoptòtic provocat per estaurosporina. A més, trobem que els agents d'unió a l'ADN pertanyents a la mateixa família que queleritrina (benzofenantridines), com la sanguinarina, també indueixen l'activació prematura de les caspases. Per altra banda, el procés de mort desencadenat per queleritrina s'evita quan diferents antioxidants tiòlics s'afegeixen al medi de cultiu. A més a més, aquest fet coincideix en què queleritrina provoca que un elevat percentatge de cèl·lules pateixin estrès oxidatiu de forma anticipada mitjançant la detecció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). Per últim, l'addició de determinades concentracions de DTT (*dithiothreitol*), un antioxidant tiòlic, retarda l'activació de caspases i recupera la morfologia apoptòtica de tipus II en cèl·lules tractades amb queleritrina. En aquestes condicions, en canvi, no s'observa cap signe de degradació oligonucleosomal de l'ADN. Aquest fet coincideix en què les propietats intercalants de queleritrina sobre l'ADN encara es mantenen.

Tot plegat, el conjunt dels resultats obtinguts en aquest treball estableix que els processos d'estrès oxidatiu i les propietats d'unió a l'ADN són determinants en la manifestació de diferents fenotips de mort. Així, una producció prematura de ROS podria associar-se amb una activació anticipada de les caspases, fet que seria contraproductiu per la consecució d'un fenotip apoptòtic canònic en la cèl·lula destinada a morir. Per altra banda, les propietats intercalants sobre l'ADN d'una determinada molècula, per exemple, un quimioteràpic, estaria desfavorint l'acció enzimàtica de CAD sobre la cromatina respecte a la fragmentació en doble cadena de l'ADN per generar fragments oligonucleosomals, però no la capacitat d'aquesta per facilitar la compactació i fragmentació del nucli durant l'estímul citotòxic.

En conclusió, el procés de mort cel·lular induït per queleritrina esdevé una eina de manifesta rellevància que ens permet l'exploració de nous processos de mort cel·lular i, per tant, l'estudi de mecanismes moleculars que puguin estar implicats en l'evasió de la mort apoptòtica canònica.

The classic definition of apoptotic cell death ascertains the presence of type II apoptotic nuclear morphology (chromatin condensation and fragmentation of the nucleus) and oligonucleosomal DNA degradation or LMW (low molecular weight). Cells derived from human neuroblastoma SH-SY5Y have this cell death phenotype upon a cytotoxic stimulus as for example staurosporine. In the present study, we demonstrate that the SH-SY5Y cells undergo a process of cell death in a homogeneous way with a nuclear non-apoptotic phenotype after the challenge with a benzophenanthridine alkaloid, chelerythrine. This nuclear non-apoptotic phenotype is also shown in other cell lines derived from human neuroblastoma upon the chelerythrine treatment. In addition, we establish that this alkaloid is not able to induce the oligonucleosomal DNA degradation, even when the cell death percentages reached are higher than the values obtained with treatment of staurosporine. On the other hand, we show that the non-apoptotic nuclear phenotype appears early. It depends on anticipatory activation of caspases in a cell death process which triggers quickly. In this context, the increase of CAD levels expression, the main endonuclease responsible for DNA apoptotic degradation and nuclear morphology of type II, does not restore the apoptotic phenotype after the treatment with chelerythrine. Moreover, we demonstrate that the SH-SY5Y cells show the non-apoptotic cell death phenotype induced by the alkaloid although CAD is located in the chromatin-enriched fraction. Besides this, we ascertain that the cell death induced by chelerythrine is concomitant with the presence of DNA intercalating properties from this alkaloid. In this sense, we show that other DNA binding agents, just like chelerythrine, avoid the apoptotic phenotype induced by staurosporine. Furthermore, we find that the DNA binding agents belonging to the same family that chelerythrine (benzophenanthridine), such as sanguinarine, also induce a premature activation of caspases. On the other hand, the presence of different thiolic antioxidants in the culture media prevents the cell death process triggered by chelerythrine. Moreover, this fact coincides with a high percentage of cells undergoes an early oxidative stress through detection of reactive oxygen species (ROS). Finally, the addition to the culture media of certain DTT (dithiothreitol) concentrations, a thiolic antioxidant, delays the caspases activation and restores the apoptotic morphology of type II, after the treatment with chelerythrine.

Altogether, the results obtained from this work ascertain that the oxidative stress processes and DNA binding properties are crucial to the induction of different cell death phenotypes. Thus, an early ROS production relates to a premature activation of caspases, which would be counter-productive to achieve a canonical apoptotic phenotype in cells destined to die. Furthermore, the DNA intercalating properties from one particular compound, such as chemotherapeutic agent, would disadvantage the CAD enzymatic action of double-strand DNA fragments on chromatin degradation to generate the oligonucleosomal fragments. However, the DNA intercalating properties would not be able to avoid the compaction and fragmentation of the nucleus during cytotoxic stimulus.

In conclusion, the cell death process induced by chelerythrine becomes an important tool that allows us to explore new processes of cell death and, therefore, to study the molecular pathways involved in evasion to the canonical apoptotic death.

## **III. INTRODUCCIÓ**



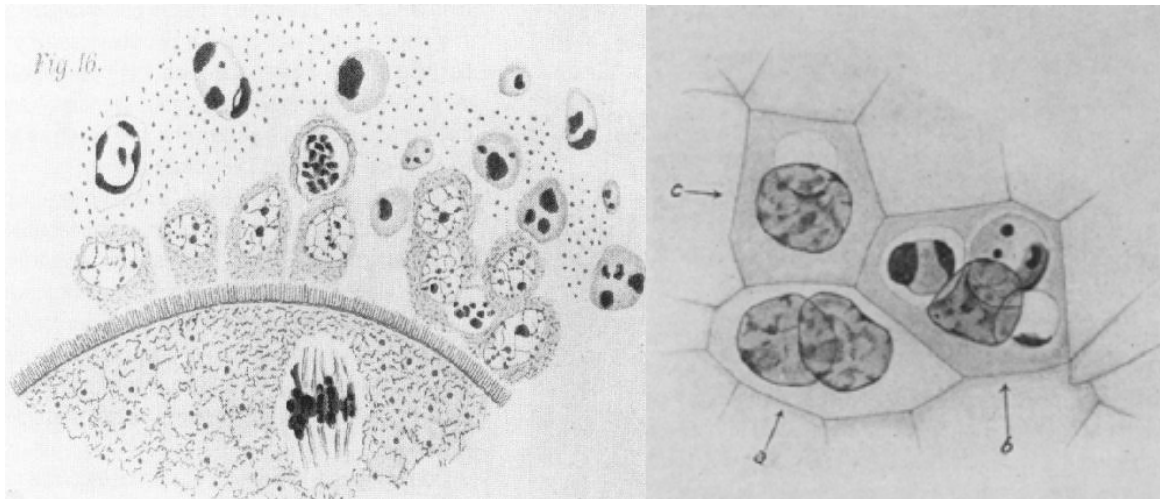


## 1. El concepte “apoptosi”: origen i rellevància biològica

Durant molt de temps s’ha definit el concepte d’apoptosi utilitzant el terme de mort cel·lular programada (PCD, *programmed cell death*) com a un procés cel·lular determinant pel manteniment i desenvolupament dels organismes multicel·lulars. Es requereix un equilibri biològic entre els processos de proliferació i mort cel·lular si es pretén garantir l’homeòstasi de l’ésser viu. Un desordre en la mort cel·lular pot derivar a diferents patologies. És per això, que aquest procés requereix d’una regulació tant a nivell cel·lular com molecular.

Les primeres al·lusions al concepte de mort cel·lular com a un procés fisiològic i crític pel desenvolupament d’organismes animals no es trobaren fins a mitjans del segle XIX. La mort cel·lular es va reportar per primer cop al 1842 per Vogt, en estudis de la metamorfosi dels amfibis. Els seus treballs sustenten la idea de mort cel·lular en el sentit fisiològic fent referència a la “reabsorció” de cèl·lules i utilitzant els termes de “destrucció o desaparició” de cèl·lules (Vogt 1842). Altres treballs es van afegir a aquest concepte de mort cel·lular fisiològica, considerant-la com a un component normal pel desenvolupament animal (Glucksmann 1951). Un altre treball a destacar sobre les primeres descripcions del procés de mort cel·lular és el de Virchow. Aquest autor va descriure dos processos de mort cel·lular: *necrobiosi* (del grec *nekros*, com a mort, i *bios*, com a vida), la qual considerà com a una mort natural; i *necrosi* o degeneració tissular, aquesta darrera definida com a una mort violenta oposada a la de *necrobiosi* (Virchow 1989). Encara que ja al segle II, amb Galeno, es va citar el terme *necrosi*, aquest començà a consolidar-se amb Virchow i fins avui encara es manté aquest terme per definir una modalitat de mort similar a la descrita per aquest autor (Liddell and Scott 1968). En canvi, *necrobiosi*, acabà perdent solidesa com a concepte de mort contraposada a la *necrosi*, malgrat que posteriorment Kerr i col·laboradors l’anomenaren com a una “mort cel·lular fisiològica sense unes característiques morfològiques definides” (Kerr, Wyllie et al. 1972).

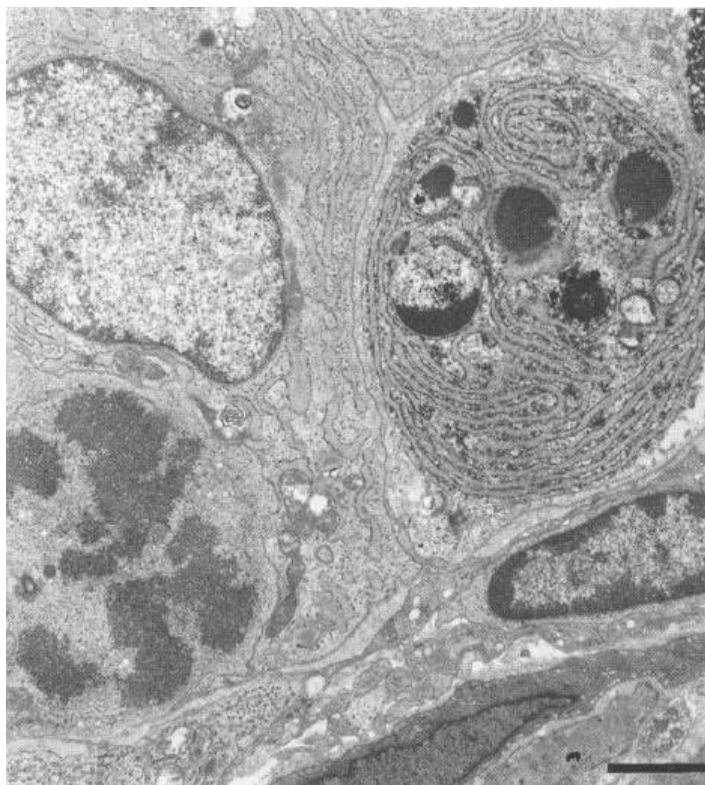
No va ser, però, fins a finals del segle XIX que s’obtingueren les primeres descripcions detallades de l’interior de cèl·lules mortes (Flemming 1885). Gràcies al desenvolupament de mètodes de fixació de teixit i de diferents tincions histològiques, Flemming creà els conceptes de cromatina i mitosi. Al seu estudi de fol·licles ovàrics en mamífers, estableix que la mort cel·lular no es produeix per una ruptura mecànica de la cèl·lula sinó que la considera un esdeveniment fisiològic. Descriu aquest concepte sota el terme de *cromatòlisi* que associa a una fragmentació dels nuclis i que coincideix amb el que avui es coneix per apoptosi. Aquesta primera manera de parlar de l’apoptosi també l’utilitzà al 1914 Gräper. En el seu estudi conclou que la *cromatòlisi* havia d’existir en tots aquells òrgans en els que les cèl·lules havien d’eliminar-se (Gräper 1914). Afirmar també que les restes cel·lulars de les cèl·lules que patien aquest procés les fagocitaven cèl·lules veïnes (Figura II).



**Figura 11. Cromatòlisi observada per Flemming al 1885 (esquerre) i Gräper al 1914 (dreta).** A l'esquerre, fol·licle ovàric de conill poc abans de la seva maduresa. Es pot observar que la majoria de cèl·lules que es troben en contacte amb l'òvul són normals (una d'elles és mitòtica); mentre que les que estan més allunyades estan patint el procés de cromatòlisi. S'observa la condensació i fragmentació del nucli típica de l'apoptosi (*Arch Anat EntwGesh* 1885, 221-244). A la dreta, la pared del sac vitel·lí durant la formació de l'embrió de *Acanthias*. S'observa la fagocitosi, per part d'una cèl·lula epitelial, d'un nucli fragmentat d'una cèl·lula veïna que ha mort en el procés embriogènic (*Arch Zellforsch* 1914, 373-394).

L'avanç en les tincions histològiques va permetre apreciar diverses morfologies nuclears apart de la pròpiament descrita com a *cromatòlisi*. Al 1889 Klebs proposà els termes de *cariòlisi*, com a un eixamplament nuclear amb una pèrdua eventual de la cromatina, i *cariorrexis*, com a una ruptura de la membrana nuclear acompanyada d'una desintegració de la cromatina en forma de grànuls (Klebs 1889). Un any més tard, Arnheim introduïa els conceptes de marginalització de la cromatina i de *pícnosi*, com a una reducció del nucli caracteritzada per una forta condensació de la cromatina (Arnheim 1890) (Figura I2). Aquests nous conceptes de descripció morfològica nuclear s'utilitzen encara avui per parlar dels diferents detalls nuclears induïts en els processos de mort cel·lular.

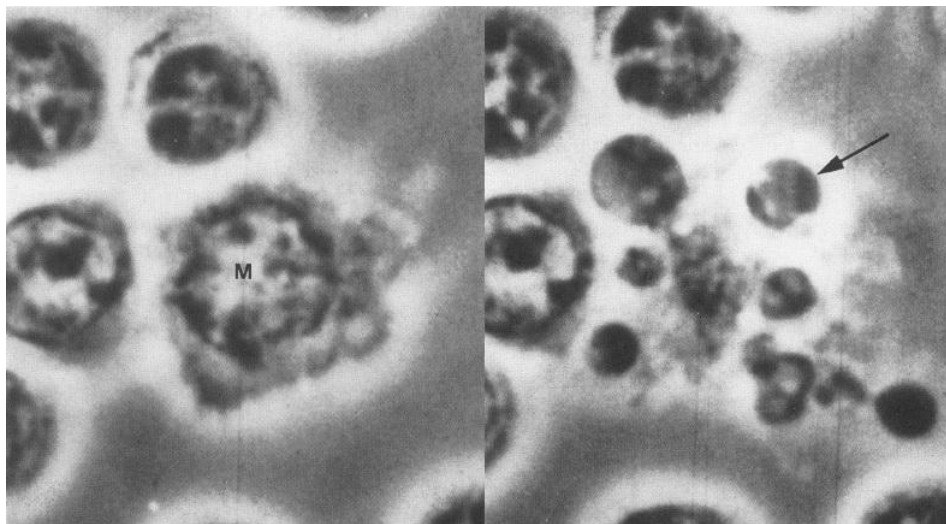
En aquesta època, també s'introduïren nous termes per referir-se a altres modalitats de mort diferents de la *cromatòlisi* com ara l'*autòlisi* i l'*oncòsi*. L'*autòlisi* es reportà al 1900 per Jacoby com a un fenomen d'autodigestió espontània cel·lular que utilitzava els propis enzims proteolítics de la cèl·lula (Jacoby 1900). D'altra banda, l'*oncòsi* s'introduí al 1910 per Recklinghausen per descriure una mort cel·lular induïda per isquèmia o agents tòxics, i caracteritzada per un inflament i increment de la permeabilitat plasmàtica (Recklinghausen 1910). Aquests termes preserven avui el seu significat i s'empren per fer referència a fenòmens de mort molt específics o part d'ells. En el cas de l'*oncòsi*, alguns autors l'utilitzen per definir l'etapa preliminar de morts cel·lulars isquèmiques que acaben derivant a un procés de mort necròtic (Majno and Joris 1995). No obstant, en la literatura actual el terme *oncòsi* s'utilitza per definir l'increment de volum cel·lular típic de la mort necròtica (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010).



**Figura 12. Mitosi (a la part inferior esquerra) i apoptosi (a la part superior dreta) com als dos principals reguladors de les poblacions cel·lulars.** En la cèl·lula apoptòtica s'observa el nucli fragmentat (cariorrèxis) i la cromatina en estat picnòtic. Un dels fragments nuclears conté la característica de la condensació de la cromatina. La imatge correspon a una micrografia electrònica de pròstata de rata després de 2 dies de castració. Barra = 2  $\mu\text{m}$  (adaptat de Majno, 1995).

A principis dels anys 50, es van reportar altres termes descriptius dels processos de mort cel·lular com el *blebbing* o el *budding*, citats avui indiferentment en la literatura científica. Al 1951, Costero i Pomerat crearen el terme de *blebbing* com a *zeiosis* (del grec com a “estic bullint”) per descriure un procés de “*bubbling*” com a bombolleig observat en cultius de teixit nerviós (Costero and Pomerat 1951). Més tard, aquest terme es consolidà com *blebbing* com a (“formació d’ampolles”) al 1955 per Boss. Aquest autor posà de manifest la presència de blebs com a prolongacions de la membrana cel·lular que apareixien i desapareixien durant la citoquinesi (Boss 1955). Pel que fa al terme de *budding* (“florida”), aquest es reportà també al mateix any per Bessis en examinar la mort cel·lular en leucòcits humans. Bessis per mitjà d’una seqüència fotogràfica presa en diferents temps, observà l’aparició d’unes prolongacions protoplasmàtiques just abans de la fragmentació cel·lular i descriví aquest comportament cel·lular com a una “fragmentació de la mort cel·lular” (Bessis, 1955) (Figura I3). No obstant, varis autors separaren aquests conceptes per remarcar-ne un ús més específic (Majno and Joris 1995; Charras 2008). Majno i Joris, per exemple, van diferenciar els dos termes considerant les prolongacions citoplasmàtiques del *budding* com “buds” (“brot”) capaços de contenir fragments nuclears i orgànuls cel·lulars sense inflar-se. A diferència dels “blebs”, que els van definir com estructures derivades de la membrana cel·lular plenes de líquid similars a una “ampolla” i que tendien a inflar-se i rebentar. Consideraren també que la seva formació podia ser reversible i els associaren a morts cel·lulars isquèmiques. El terme del *budding*, en canvi, el recomanaren més per contextos de mort apoptòtica (Majno and Joris 1995). No obstant i posteriorment a les recomanacions d’aquests autors, es van reportar processos de mort apoptòtica amb presència de blebs i Mills and Coleman inclús, els van arribar a reconèixer com a blebs idèntics als de les cèl·lules en divisió (Mills, Stone et al. 1999; Coleman, Sahai et al.

2001). Tot i així, després es va descriure que la seva presència podia ser prescindible en processos de mort cel·lular apoptòtics, pel que les cèl·lules podien patir apoptosi igualment (Nicotera, Leist et al. 1999). Per altra banda, una última distinció citada en la literatura entre diferents tipus de *blebbing* ha afavorit el seu ús dins el context apoptòtic. Mills i col·laboradors van descriure dos tipus de *blebbing*, un de més dinàmic, associat a l'execució de l'apoptosi, i un de més estàtic amb la formació de blebs més grans, relacionat amb processos de mort necròtica (Mills, Stone et al. 1999).



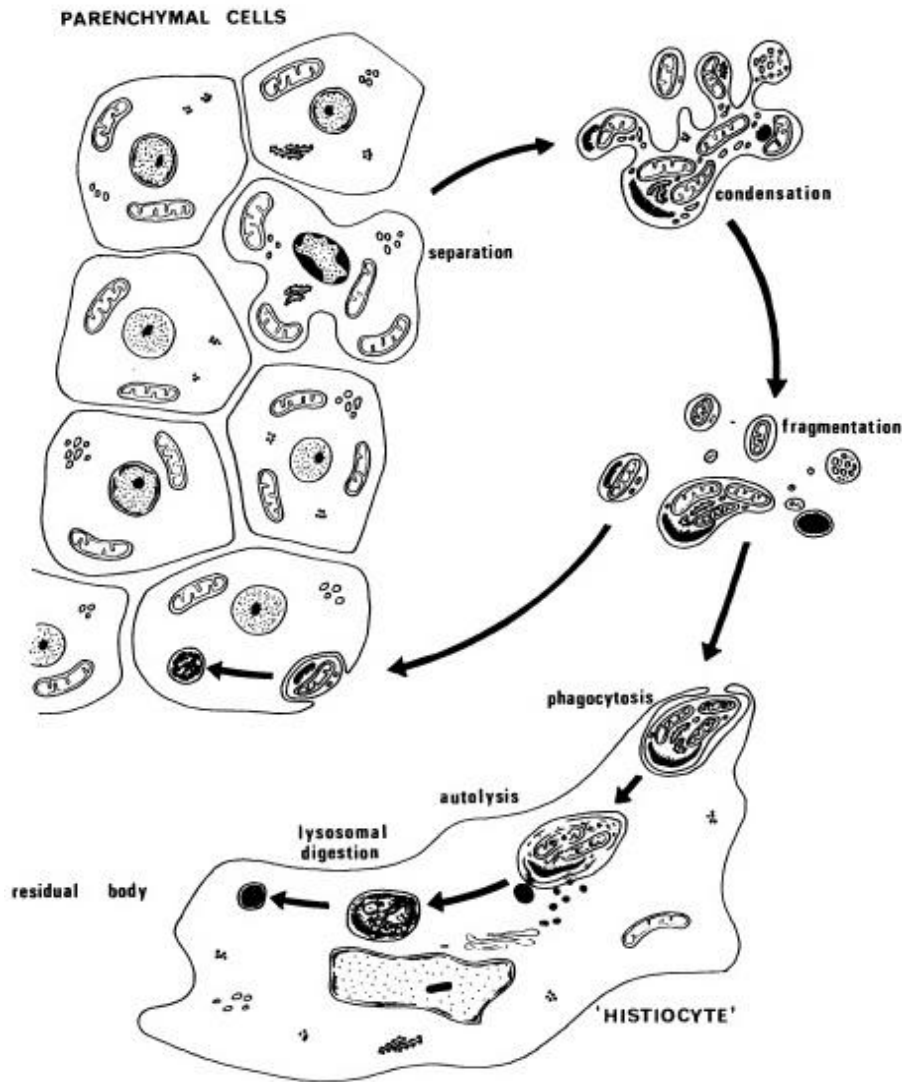
**Figura 13.** Dues imatges de la seqüència fotogràfica presa per Marcel Bessis el 1955 mostrant la mort per fragmentació cel·lular d'un leucòcit in vitro. **A l'esquerra:** un leucòcit (probablement un monòcit, M) just abans de la seva destrucció. **A la dreta:** els mateixos leucòcits 33 minuts més tard després d'un episodi de budding (no es mostra) trencats de sobte en cossos apoptòtics amb masses de cromatina denses (fletxa). (Bessis MC: Mort d'une cellule: analyse d'un film en contraste de phase. Semaine Hôpitaux 1955, 60:21-32).

A finals dels anys 50, es començà a pensar sobre la idea que el procés de mort cel·lular no era accidental, anomenant el terme del “suïcidi”. Duve proposà que les cèl·lules podien morir des del seu interior per un esclat dels seus lisosomes que actuaven com a “bosses suïcides” (De Duve and Beaufay 1959). Aquesta idea preliminar del suïcidi s'acabà consolidant al 1964 amb Lockshin & Williams amb la introducció del concepte de mort cel·lular programada o PCD. Aquests autors afirmaren que la mort cel·lular durant el desenvolupament animal no era accidental i que es determinava per una seqüència de passos estrictament controlada. En aquest sentit, proposaren que la mort cel·lular en el desenvolupament d'un organisme es produïa en llocs i moments determinats a través d'una sèrie d'esdeveniments programats (Lockshin and Williams 1965). Un any més tard, Saunders seguí emfatitzant aquesta nova idea de la mort cel·lular, però remarcant altre cop el terme del “suïcidi”. Aquest autor, en relació als seus treballs dels sistemes embrionaris, considerà que durant l'embriogènesi la mort era “un suïcidi, no un assassinat” (Saunders 1966). A més a més, un any més tard Tata reportà que aquesta mort cel·lular programada era un procés actiu, ja que requeria síntesi macromolecular. En concret, observà com en els seus estudis de metamorfosi d'amfíbis l'ús d'inhibidors de síntesi de RNA i de proteïnes era capaç de bloquejar la mort cel·lular (Tata 1966).

El concepte de mort cel·lular com a PCD, sense encara anomenar-se *apoptosi*, es va mantenir fins als anys 70. Al 1971 Kerr i els seus col·laboradors, en un experiment en el què van induir una atròfia hepàtica mitjançant la constricció d'una de les ramificacions de la vena porta, es



van adonar d'una baixada discreta del número de cèl·lules. Aquests autors van detectar que aquesta baixada del nombre de cèl·lules s'indueïa per una sèrie de canvis seqüencials que anomenaren en un primer moment *shrinkage necrosis* com a "necrosi amb encongiment" (Kerr 1971). Un any més tard, aquests autors detallaren els canvis morfològics d'una mort cel·lular que anomenaren *apoptosi* del grec com a "caiguda de les fulles dels arbres o dels pètals de les flors". Aquest nom pretenia remarcar el procés d'una mort que succeïa de forma natural o fisiològica durant el desenvolupament, respecte una mort patològica generada per un dany agut que definiren com a "necrosi coagulativa" (Kerr, Wyllie et al. 1972). El seu treball establí les diferències entre aquests dos tipus de mort cel·lular a partir de les descripcions morfològiques obtingudes amb imatges de microscopia electrònica en teixits d'organismes animals adults i cèl·lules embrionàries. En concret, van resumir els canvis estructurals de l'*apoptosi* en dues etapes directes: formació dels cossos apoptòtics i fagocitosi d'aquests per altres cèl·lules (Figura I4). La formació dels cossos apoptòtics implicava fenòmens cel·lulars com la condensació marcada del nucli i del citoplasma, la fragmentació nuclear i la presència d'unes protuberàncies a la superfície de la cèl·lula. Aquestes protuberàncies permetien la formació d'aquests cossos on la membrana es mantenia delimitada i compacta per preservar l'estat de les restes cel·lulars. Segons aquest treball doncs, el contingut d'aquests cossos apoptòtics es determinava pels constituents cel·lulars que havien estat presents en la protuberància citoplasmàtica i que conseqüentment els hi havia donat origen. De fet, en tots els seus teixits estudiats, la majoria dels cossos apoptòtics es trobaven intactes dins dels citoplasmes d'altres cèl·lules. Aquest fet suggerí a Kerr i col·laboradors una ràpida fagocitosi deguda possiblement a un canvi de les propietats en la superfície de les membranes. De fet, els mateixos autors van descriure en detall el mecanisme de la fagocitosi. En concret, definiren aquest mecanisme com a un procés que es basava en contenir els cossos apoptòtics en vesícules endocítiques (fagosomes) que posteriorment es fusionaven amb els lisosomes de la cèl·lula fagocítica. La funció d'aquests orgànuls l'associaven a la degradació dels cossos apoptòtics a través dels seus enzims hidrolítics. Tot i així, els autors d'aquest treball observaren que la degeneració dels cossos apoptòtics ja s'iniciava per autolisi als fagosomes de forma prèvia a la fusió amb els lisosomes. Kerr i col·laboradors també van esmentar la manca d'inflamació en els processos de mort amb presència de cossos apoptòtics, en comparació al procés de "necrosi coagulativa". Malgrat les múltiples descripcions, els autors d'aquest treball no arribaren a aprofunditzar sobre els esdeveniments morfològics apoptòtics inicials. Tan sols esmentaren que les cèl·lules destinades a morir per *apoptosi* es separaven prèviament de les seves cèl·lules veïnes i mostrant una agregació de la cromatina en masses denses sota l'envolta nuclear. Tot i així, des de la definició de Kerr i col·laboradors, el terme *apoptosi* s'ha utilitzat àmpliament per la comunitat científica i durant molt de temps s'ha considerat com a sinònim de PCD. Veurem com al llarg dels diferents tipus de classificacions dels processos de mort el terme *apoptosi* i altres conceptes segueixen sent revisats en la literatura científica fins al dia d'avui.



**Figura 14.** Diagrama original de Kerr per mostrar les característiques morfològiques de l'apoptosi (font: (Kerr, Wyllie et al. 1972)).

Analitzat l'origen del concepte d'apoptosi i els múltiples termes introduïts per descriure els processos de mort cel·lular, a continuació s'analitza la rellevància biològica d'aquest procés i com, en molts exemples, la seva execució és determinant pel manteniment i desenvolupament dels organismes multicel·lulars.

Les cèl·lules d'un organisme multicel·lular estan constantment sotmeses a un procés fisiològic de mort cel·lular en continu equilibri amb la proliferació per tal de garantir l'homeòstasi i desenvolupament de l'organisme. D'aquí deriva també, la important regulació de l'apoptosi sobretot a nivell de desenvolupament embrionari i fetal per tal de garantir la correcta formació de totes les estructures cel·lulars de l'organisme. En general, les funcions biològiques de l'apoptosi més rellevants en el desenvolupament i homeòstasi cel·lular es reporten en les següents: remodelació d'estructures, pèrdua d'estructures no necessàries, control del número de cèl·lules, eliminació de cèl·lules anormals, no funcionals o danyades i producció de cèl·lules diferenciades sense orgànuls (Ellis, Yuan et al. 1991; Jacobson, Weil et al. 1997) (Figura I5).

Pel que fa a la remodelació d'estructures, un exemple n'és la formació individualitzada dels cinc dits dels humans durant el desenvolupament fetal a través de l'eliminació de les àrees interdigitals (Ellis, Yuan et al. 1991). De fet, en aquest i altres exemples de remodelació d'estructures, moltes cèl·lules es produeixen en excés i es sotmeten a posteriors processos de mort cel·lular per tal de contribuir a l'estructura final de molts òrgans i teixits (Meier, Finch et al. 2000).

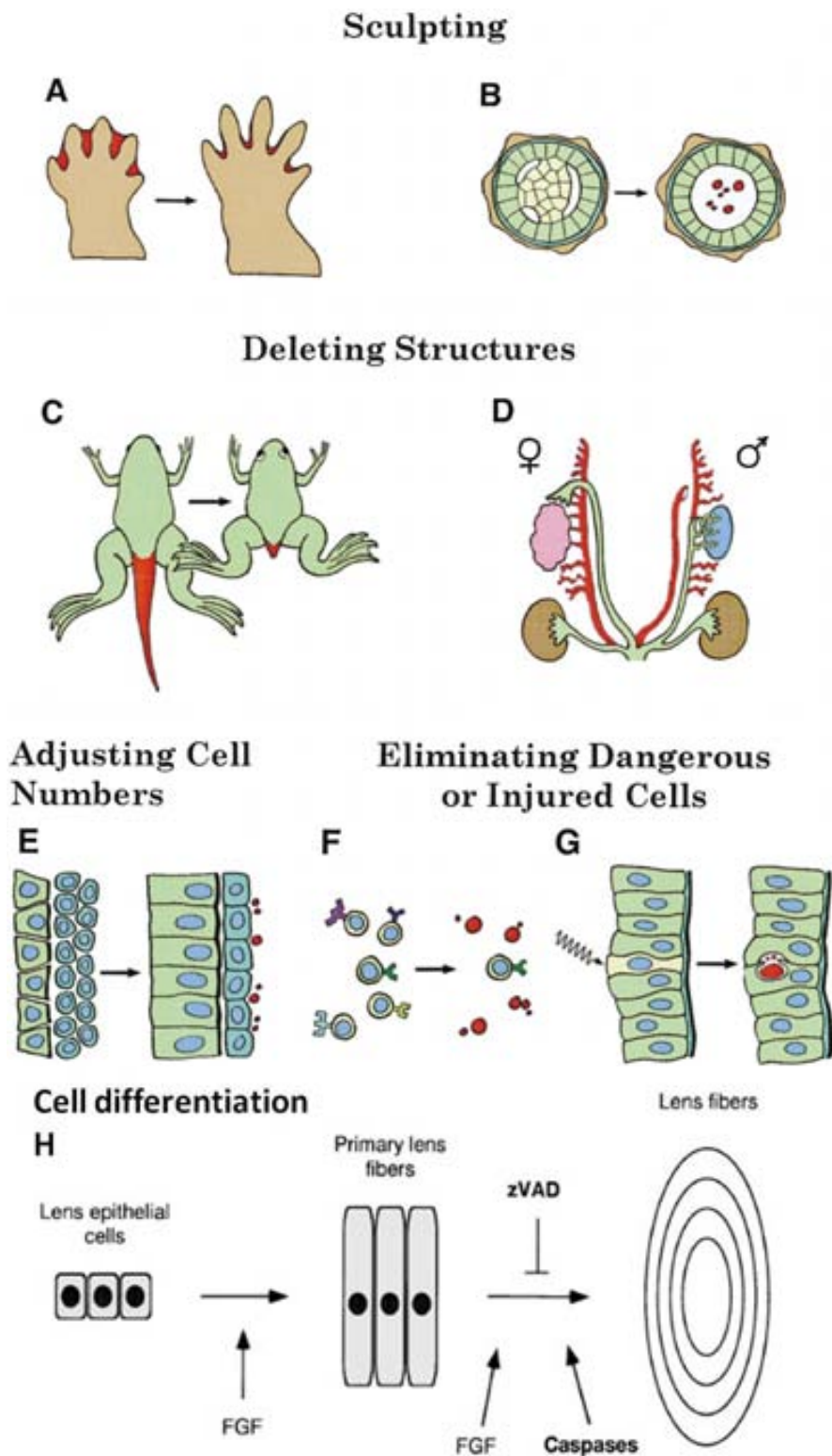
Així també, durant el desenvolupament animal es formen estructures que després són necessàries eliminar. És el cas d'estructures requerides en les espècies ancestrals però no en les descendents i que evolutivament han acabat perdent la seva utilitat, o bé d'aquelles que només es requereixen en determinades etapes o són només necessàries en un dels dos sexes. Un exemple n'és la pèrdua de la cua dels capgrossos durant la metamorfosi dels amfibis (Ellis, Yuan et al. 1991).

L'apoptosi també té un paper fonamental en la regulació del nombre de cèl·lules. En molts òrgans hi ha sobreproducció de cèl·lules que després es sacrifiquen per ajustar-ne el nombre. En el sistema nerviós dels vertebrats per exemple, durant el seu desenvolupament el nombre de neurones i oligodendròcits es generen en excés i més de la meitat s'eliminen per apoptosi (Jacobson, Weil et al. 1997).

En el procés d'eliminació de cèl·lules anormals, no funcionals o danyades controlat per l'apoptosi es pot posar de manifest el procés de selecció de limfòcits T i B. La seva eliminació per apoptosi permet seleccionar i mantenir un nombre constant de limfòcits estrictament eficients en el reconeixement específic de l'antigen (Ellis, Yuan et al. 1991; Jacobson, Weil et al. 1997; Rathmell and Thompson 2002).

La producció de cèl·lules diferenciades sense orgànuls com una altra funció biològica de l'apoptosi s'analitza en el context de la família de proteases cisteïna caspases (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) (veure apartat 3. "Bioquímica de l'apoptosi: les caspases"). Certs tipus cel·lulars com els queratinòcits, les cèl·lules epitelials del cristal·lí o els glòbuls vermells dels mamífers perden els seus nuclis i orgànuls a través de processos de diferenciació terminal en els que les caspases estan implicades (Figura I5) (Jacobson, Weil et al. 1997; Zeuner, Eramo et al. 1999).

Tot plegat fa que entenguem l'apoptosi amb una àmplia rellevància biològica en el sentit fisiològic de desenvolupament i homeòstasi dels organismes multicel·lulars. Aquesta rellevància biològica de l'apoptosi, però, va lligada inevitablement també a un sentit patològic. Un defecte excessiu en l'activació dels processos apoptòtics implica l'aparició de malalties humanes com el càncer, malalties autoimmunes i infeccions virals. En canvi, un excés d'activació de l'apoptosi s'associa a malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o el Parkinson, o a altres patologies humanes com el SIDA o l'osteoporosi, entre d'altres (Thompson 1995).



**Figura 15. Funcions biològiques de l'apoptosi.** (A i B) Remodelació d'estructures, (C i D) pèrdua d'estructures no necessàries, (E) control del nombre de cèl·lules, (F i G) eliminació de cèl·lules no funcionals, anormals o danyades i (H) implicació en la regulació de certs processos de diferenciació cel·lular (modificat de (Jacobson, Weil et al. 1997; Zeuner, Eramo et al. 1999).

## 2. Classificacions dels processos de mort cel·lular

### 2.1. Primera classificació: tipus de mort segons les característiques morfològiques cel·lulars

Merker i Schweichel el 1973 realitzaren la primera classificació de la mort cel·lular segons característiques morfològiques cel·lulars (Schweichel and Merker 1973). S'establiren tres tipus de mort cel·lular:

- “**mort cel·lular tipus I**” associada a heterofàgia.
- “**mort cel·lular tipus II**” associada amb autofàgia.
- “**mort cel·lular tipus III**” no associada a cap tipus de digestió i definida com mort no lisosomal.

Aquests tipus de mort es consideren equivalents als actuals processos de mort d'apoptosi, autofàgia i necrosi respectivament a l'ordre esmentat per aquests autors (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). No obstant, més tard una revisió de Clarke (Clarke 1990) estipulà subtipus de mort cel·lular pel que es reanomenà la nomenclatura utilitzada per Merker i Schweichel com a:

- “**mort tipus 1 o apoptosi**”.
- “**mort tipus 2 o mort autofàgica**”.
- “**mort tipus 3 o degradació vesicular no lisosomal**”.

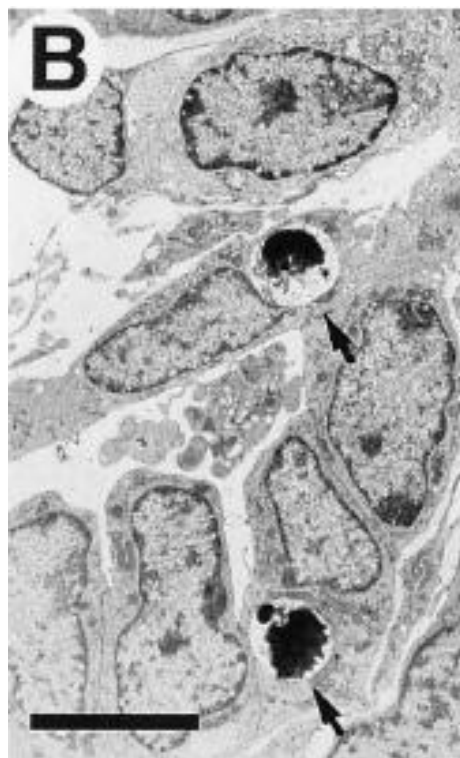
En el darrer tipus de mort cel·lular, s'inclogueren la “**mort tipus 3A o desintegració no lisosomal**” i “**mort tipus 3B o citoplasmàtica**” (Clarke 1990).

#### 2.1.1. Mort de tipus 1 o “apoptosi”

Les característiques morfològiques de la mort tipus 1 o apoptosi coincideixen amb les descripcions detallades analitzades anteriorment per Kerr i col·laboradors (Kerr, Wyllie et al. 1972). Tenint en compte aquestes aportacions morfològiques i els múltiples termes de mort cel·lular reportats, les principals característiques morfològiques de la cèl·lula apoptòtica es resumeixen en les següents: presentació de *shrinkage* o “encongiment” cel·lular, marginalització i condensació de la cromatina sota l'envolta nuclear amb una posterior fragmentació nuclear o *cariorrhexis*, i presència de protuberàncies citoplasmàtiques formades pel fenomen de *budding* o *blebbing*. En resum, l'adquisició d'aquestes característiques morfològiques permet la generació dels cossos apoptòtics i afavoreix la fagocitosis d'aquests per macròfags o cèl·lules veïnes, malgrat aquestes no siguin fagòcits professionals (Figura I6). En conseqüència, s'evita l'alliberament del contingut cel·lular apoptòtic a l'espai extracel·lular i el desencadenament de posteriors processos d'inflamació.

L'execució de l'apoptosi, però, no solament s'associa a l'adquisició de diferents característiques morfològiques de la cèl·lula apoptòtica, malgrat la primera classificació de mort es basi en trets morfològics. Això en part es deu a què els apunts morfològics apoptòtics van ser previs als bioquímics i per la concordança amb l'avanç de les tècniques de biologia cel·lular i molecular. En aquest sentit, la detecció de característiques bioquímiques en les cèl·lules apoptòtiques començà a reportar-se a finals dels anys 70 amb el descobriment de la degradació apoptòtica de l'ADN coneguda com a *ladder*. La descoberta del fenomen bioquímic *ladder* es realitzà en estudis independents de l'apoptosi, on s'utilitzaren teixits limfoides irradiats en els que

prèviament s'havia vist que el seu nucli estava fragmentat (Spear & Glücksman, 1938). Va ser més tard, quan tres grups de forma independent van aconseguir analitzar primer al 1976 (Skalka, Matyasova et al. 1976) i després al 1981 (Yamada, Ohyama et al. 1981; Zhivotovsky, Zvonareva et al. 1981), la cromatina d'aquest mateix tipus de teixits irradiats. L'anàlisi electroforètic revelà que la cromatina es trencava en fragments que produïen un patró semblant al d'una "escala" donant el definitiu nom de "ladder". Aquest fet va suggerir que aquesta degradació de l'ADN provenia d'una fragmentació internucleosomal que generava fragments del tamany d'un o varis nucleosomes (Zhivotovsky, Zvonareva et al. 1981). Finalment, al 1984 s'acabà relacionant el patró de degradació de l'ADN *ladder* amb el fenomen de l'apoptosi. D'aquesta manera, s'afegí un marcador bioquímic específic als canvis morfològics de les cèl·lules apoptòtiques (Wyllie, Morris et al. 1984). Aquest descobriment va iniciar una onada de publicacions científiques referides a l'apoptosi entre les que va remarcar de forma considerable l'estudi d'Ellis i Horvitz al 1986 sobre els gens implicats en el suïcidi cel·lular en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* (Ellis and Horvitz 1986). Finalment, es van descobrir en mamífers els gens homòlegs i es designà el conjunt d'enzims hidrolítics implicats en la regulació de l'apoptosi, com a la família de proteases cisteïna *cysteine-dependent aspartate-directed proteases* definida, així, sota el terme de caspases (Alnemri, Livingston et al. 1996). Més tard es va veure que aquestes proteases processaven múltiples substrats que contribuïen a l'adquisició de les principals característiques morfològiques i bioquímiques de la cèl·lula apoptòtica (Timmer and Salvesen 2007; Luthi and Martin 2007). Aquesta família d'enzims proteolítics és la principal maquinària bioquímica de l'apoptosi i la seva activació és clau pel desmantellament de la cèl·lula apoptòtica.



**Figura 16.** Fagocitosis de dos cossos apoptòtics en el desenvolupament d'un ronyó de ratolí (indicat per les fletxes). Barra = 5  $\mu\text{m}$  (modificat de Coles, 1993).

### 2.1.2. Mort de tipus 2 o “mort autofàgica”

La mort de tipus 2 es caracteritza principalment per una vacuolització massiva del citoplasma autofàgica. És la pròpia cèl·lula qui realitza una digestió del seu citoplasma a partir de la formació de nombroses vacuoles (Schweichel and Merker 1973). La destrucció cel·lular autofàgica té lloc a través dels propis enzims lisosomals de la cèl·lula i les restes cel·lulars d'aquest procés de mort, en alguns casos, s'eliminen per heterofàgia (Pautou and Kiény 1971). El fenomen heterofàgic en aquesta mort, però, es descriu en etapes molt tardanes i amb menys rellevància biològica que en el cas de la mort tipus I o apoptosi (Krstic and Pexieder 1973). Per altra banda, varis orgànuls cel·lulars com el reticle endoplasmàtic, les mitocondries i l'aparell de golgi poden dilatar-se i hi ha opció que les cèl·lules autofàgiques presentin *blebbing* (Peluso, England-Charlesworth et al. 1980). Aquest tipus de mort també, pot portar a la pèrdua d'estructures que deriven de les membranes cel·lulars com ara el *microvilli* (Salzgeber and Weber 1966) o els complexos d'unió intracel·lulars com les *gap junctions* (Clarke 1990) en les cèl·lules epitelials. A part de canvis en la membrana plasmàtica, en la mort autofàgica també es reporten canvis en el nucli de tipus picnòtic però només molt ocasionalment. Aquests canvis es van descriure tant en les etapes més prematures d'aquesta mort (Hornung, Koppel et al. 1989), com en les més tardanes (Beaulaton and Lockshin 1982).

### 2.1.3. Mort de tipus 3 o “degradació vesicular no lisosomal”

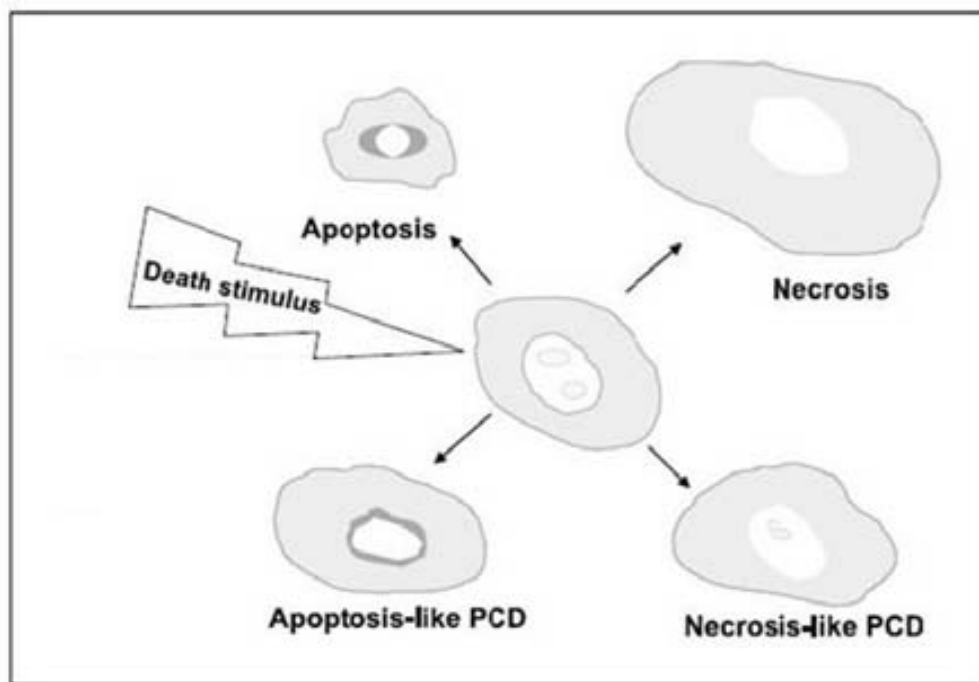
La mort tipus 3 es caracteritza per una desintegració general de la cèl·lula amb una pèrdua completa dels orgànuls cel·lulars. De forma més concreta, les cèl·lules que pateixen la mort tipus 3A o desintegració no lisosomal presenten una dilatació dels orgànuls cel·lulars i la formació d'espais buits del citoplasma que es fusionen entre ells i que poden arribar a connectar-se amb l'espai extracel·lular. La cèl·lula es destrueix degut a la desintegració dels diferents components cel·lulars en fragments petits que poden, inclús, no arribar a detectar-se ni per microscopia electrònica. De forma similar, la membrana plasmàtica també s'acaba desintegrant però per mitjà d'una fragmentació massiva. En última instància, el nucli també s'acaba destruint. La desintegració cel·lular d'aquest procés de mort succeeix sense l'actuació dels enzims lisosomals de la cèl·lula ni el fenomen de fagocitosi per part de les cèl·lules veïnes. No hi ha, per tant, cap símbol d'heterofàgia (Schweichel and Merker 1973). Pel que fa a l'altre tipus de mort tipus 3B o desintegració citoplasmàtica, es diferencia respecte al tipus 3A pels canvis que pateix el nucli i la membrana plasmàtica (Clarke 1990). En concret, la membrana plasmàtica es contrau i el nucli en canvi, tot i que també de forma tardana, acaba patint cariòlisi (Clarke 1990).

## 2.2. Evolució del concepte PCD

Durant moltes dècades la comunitat científica ha utilitzat el terme de PCD com a sinònim d'apoptosi. A més a més, l'apoptosi s'associava recurrentment a l'activació de les caspases. No obstant, l'aparició de treballs que reportaven processos de mort que podien succeir sense l'activació de caspases, portà a revisar el concepte de PCD (Lockshin and Zakeri 2002; Susin, Daugas et al. 2000).

Jäättelä i col·laboradors són els autors que van revisar aquest concepte establint una nova classificació dels processos de mort de cel·lular (Jaattela and Tschopp 2003). Aquesta classificació es va fer segons la morfologia nuclear i distingia entre diferents tipus de mort PCD depenents de determinats esdeveniments de senyalització. D'aquesta manera, es van incloure des dels processos de mort depenents de caspases com l'apoptosi o apoptosi clàssica, als independents de caspases

com l'*apoptosis-like* PCD i la *necrosi-like* PCD. Per últim, cal remarcar que aquesta classificació inclou un procés de mort cel·lular no PCD referit a la necrosi accidental (Figura I7).



**Figura I7.** Classificació de la mort cel·lular en processos PCD segons la morfologia nuclear i processos no PCD. S'inclouen com a processos de mort PCD: apoptosi, *apoptosis-like* PCD i *necrosi-like* PCD. Entre aquests apoptosi o també anomenada apoptosi clàssica es considera un procés de mort PCD dependent de caspases. *Apoptosis-like* PCD i *necrosi-like* PCD, s'inclouen com a processos PCD independents de caspases. Necrosi es considera un procés de mort no PCD i correspon a la necrosi accidental (adaptat de (Broker, Kruyt et al. 2005)).

### 2.2.1. Tipus de PCD segons la morfologia del nucli

#### 2.2.1.A. Apoptosi clàssica

Aquesta apoptosi es caracteritza per presentar una condensació compacta de la cromatina i una fragmentació del nucli que condueix a la presència de figures geomètriques simples globulars o en forma de mitja lluna (Leist and Jaattela 2001) (Figura I8). Aquest fenotip nuclear de mort s'associa amb altres característiques morfològiques apoptòtiques definides ja per Kerr, tals com el *shrinkage* i la generació dels cossos apoptòtics. Aquesta morfologia s'estableix com a la morfologia apoptòtica clàssica i es reconeix com a la morfologia nuclear tipus II o estat II de la condensació de la cromatina (Susin, Daugas et al. 2000). La manifestació d'aquest fenotip de mort s'associa a l'activació de caspasa-3 i a l'endonucleasa CAD (Enari, Sakahira et al. 1998).

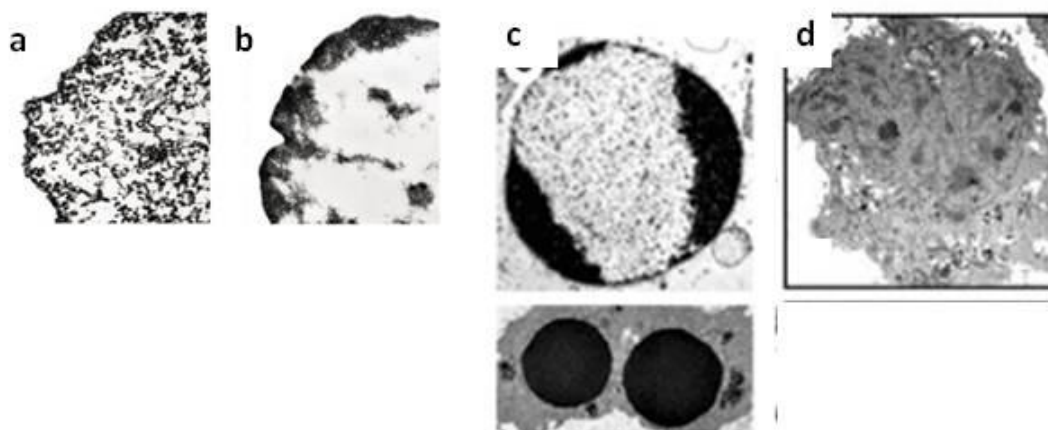
#### 2.2.1.B. *Apoptosis-like* PCD

La morfologia nuclear d'aquest procés de mort apoptòtic es caracteritza per la presència d'una menor compactació de la cromatina, la qual tendeix a marginalitzar-se a la perifèria nuclear (Leist and Jaattela 2001) (Figura I8). Aquest fenotip nuclear s'identificà com a morfologia nuclear tipus I o estadi I de la condensació de la cromatina (Susin, Daugas et al. 2000). L'*apoptosis-like* PCD es relaciona amb processos de mort independents de caspases regulats per executors com els factors mitocondrials pro-apoptòtics AIF (apoptosis-inducing factor) i endonucleasa G, o les cathepsines (Jaattela and Tschopp 2003).



### 2.2.1.C. *Necrosi-like* PCD

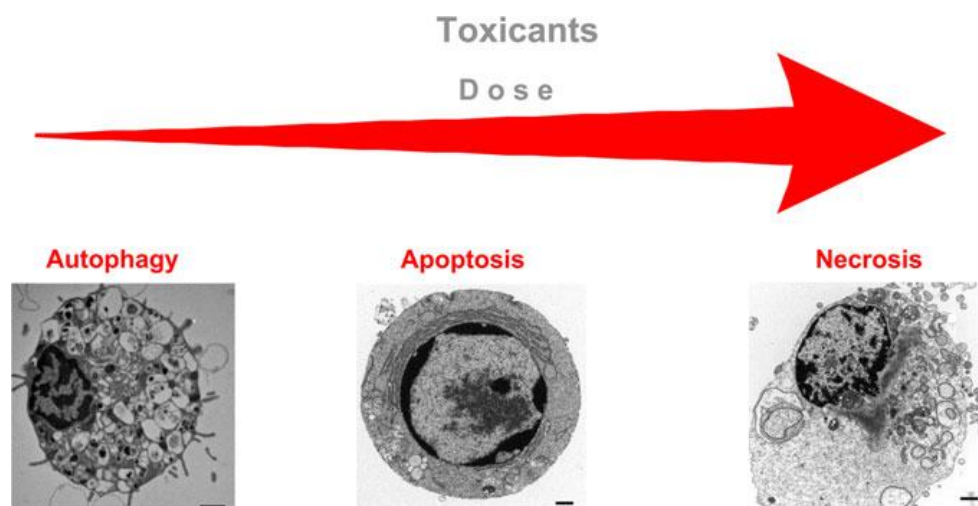
El terme de *necrosi-like* PCD s'introdueix per definir aquelles morts independents de caspases amb una absència completa de la condensació de la cromatina o com a molt, amb agrupacions de cromatina poc definides (Figura I8). En aquest procés de mort PCD, també s'engloben determinades modalitats de mort que coincideixen amb l'absència de la condensació de la cromatina i de l'activació de caspases. D'una banda s'inclouen processos de mort descrits com una "apoptosi abortiva", en els què s'inicia un programa d'apoptosi estàndard posteriorment bloquejat a nivell d'activació de caspases (Sancho-Martinez, Piedrafita et al. 2011). D'altra banda, s'engloben l'autofàgia anomenada també mort PCD tipus II i una modalitat de mort cel·lular necròtica induïda a través de receptors de mort (Jaattela and Tschopp 2003); (Chi, Kitanaka et al. 1999; Holler, Zaru et al. 2000). Per últim, cal dir que la *necrosi-like* PCD s'ha relacionat amb els següents mecanismes de senyalització: producció de les espècies reactives de l'oxigen (ROS de *reactive oxygen species*) (Vercammen, Brouckaert et al. 1998), l'activació de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*) (Ha and Snyder 1999), les molècules de senyalització intracel·lular claus en la mort necròtica de receptors de mort com la quinasa RIP (*receptor-interacting protein*) (Holler, Zaru et al. 2000), o bé, amb la participació de proteases serina (Denecker, Vercammen et al. 2001).



**Figura I8. Morfologies nuclears dels processos de mort PCD.** Varis detalls nuclears obtinguts per microscopia electrònica: morfologia nuclear d'una cèl·lula control (a); *apoptosis-like* PCD observada en b, microinjecció d'AIF causant la marginalització de la cromatina; apoptosi clàssica amb compactació de la cromatina a la perifèria de l'envolta nuclear sota les formes de "mitges llunes" (c, imatge superior) i fragmentació de la cromatina en dues esferes compactes (c, imatge inferior); *necrosi-like* PCD amb absència de condensació de la cromatina en un tractament amb daunorubicina (e) (modificat de Jäättelä, 2001).

### 2.2.2. Tipus de mort cel·lular no PCD: necrosi accidental

La necrosi accidental considerada com a mort cel·lular caòtica i totalment descontrolada és la concepció oposada al terme PCD. No hi han mecanismes de senyalització associats a l'execució d'aquest procés de mort cel·lular. La única manera de prevenir el seu desencadenament és retirant l'estímul de mort. Morfològicament, la mort necròtica s'associa amb un *oedema* o inflament cel·lular amb un posterior trencament de la membrana plasmàtica. L'adquisició de la morfologia del teixit necròtic es deu més als esdeveniments *postmortem*, és a dir, als produïts després del trencament de la membrana plasmàtica (Leist and Jaattela 2001). Per últim, cal remarcar que la necrosi accidental es relaciona més amb una mort necròtica manifestada després d'exposicions d'altres concentracions de detergents, oxidants, ionòfors o d'elevades intensitats d'un insult patològic. En aquest sentit, cal dir que en molts casos un mateix estímul de mort és capaç d'induir diferents modalitats de mort depenent de la seva dosi citotòxica (Figura I9).



**Figura 19.** Morfologies nuclears de les modalitats de mort adquirides segons el grau de toxicitat de l'estímul de mort. La mort autofàgica o l'apoptòtica s'indueixen a dosis menors d'un agent citotòxic, mentre que la mort necròtica succeeix amb dosis citotòxiques més elevades del mateix estímul de mort (font: (Orrenius, Nicotera et al. 2010)).

### 2.3. Última classificació: recomanacions del Comitè de Nomenclatura en Mort Cel·lular (NCCD)

La gran varietat de processos de mort reportats fins ara en la literatura plantejà una revisió de les terminologies emprades fins ara. És per això, que una sèrie d'experts en mort cel·lular constituïren el 2005 l'anomenat "Comitè de Nomenclatura en Mort Cel·lular" (NCCD de *Nomenclature Committee on Cell Death*) amb l'objectiu de revisar les terminologies i les classificacions dels diferents processos de mort cel·lular. La seva primera classificació es creà el 2005 i en base principalment a criteris morfològics sense fer referència a criteris bioquímics (Kroemer, El-Deiry et al. 2005). Posteriorment, el 2009 el NCCD va tornar a revisar la terminologia i unificà criteris tant morfològics com bioquímics en una nova classificació dels processos de mort cel·lular (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Finalment, el 2012 van establir la darrera i actual classificació però en base només a criteris bioquímics (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

#### 2.3.1. Tipus de mort acceptats per la NCCD

La última classificació dels processos de mort cel·lular feta per la NCCD té en compte les següents modalitats de mort:

- 1) **Necrosi regulada**
- 2) **Autofàgia**
- 3) **Anoikis**
- 4) **Entosi**
- 5) **Catàstrofe mitòtica**
- 6) **Parthanatos**
- 7) **Piroptosi**
- 8) **Cornificació**

## 9) Netosi

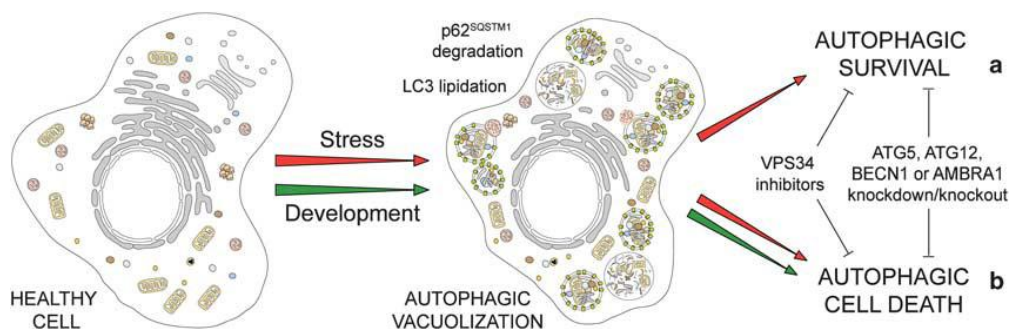
## 10) Apoptosi independent de caspases

## 11) Apoptosi dependent de caspases: via extrínseca i via intrínseca

A continuació, s'explicaren breument els diferents processos de mort cel·lular esmentats en aquesta darrera classificació.

**1) Necrosi regulada.** Necrosi es defineix preferencialment per la NCCD com a necrosi regulada, la qual s'oposa al concepte clàssic de necrosi com a procés de mort cel·lular accidental. Només insten a utilitzar el terme accidental en aquelles morts cel·lulars amb característiques morfològiques necròtiques que es desencadenen per estímuls citotòxics extrems i que no es poden inhibir ni a nivell genètic ni farmacològic. D'aquesta manera, entenen el concepte de necrosi regulada com a una modalitat de mort necròtica dependent de certes molècules de senyalització. Entre aquestes destaquen les proteïnes quinases RIP1/RIPK1 i RIP3/RIPK3 (*receptor-interacting protein kinase*) que defineixen el cas específic de necrosi regulada anomenat necroptosi (Holler, Zaru et al. 2000; Cho, Challa et al. 2009). Necroptosi s'ha utilitzat equívocament com a sinònim de necrosi regulada. En aquest sentit, la NCCD insta a utilitzar el terme general de necrosi regulada davant l'específic de necroptosi, el qual només s'ha d'emprar per definir aquells casos concrets de necrosi regulada dependents de RIP1 i/o RIP3 (Aquesta mort s'analiza més àmpliament en l'apartat 2.3.3.B. "Necroptosi").

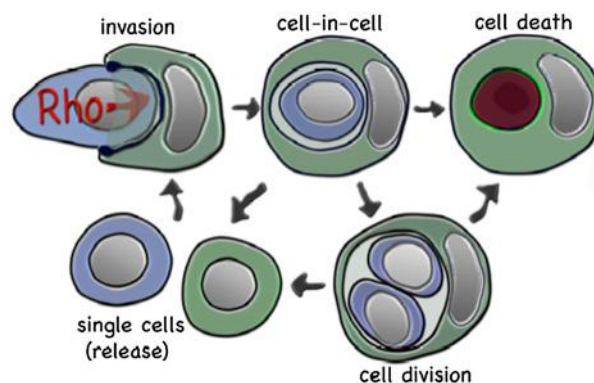
**2) Autofàgia.** L'autofàgia es caracteritza per una vacuolització massiva del citoplasma mitjançant la formació de les vesícules de doble membrana anomenades autofagosomes. La presència d'aquestes vesícules de doble membrana i la de les proteïnes ATG (*autophagy-related genes*) necessàries per la seva formació, són els principals trets diferencials respecte a les altres modalitats de mort cel·lular (Marino and Lopez-Otin 2004). L'autofàgia s'indueix com a resposta cel·lular a situacions extremes de manca de nutrients o dany d'òrgans cel·lulars. En aquest sentit, aquest procés de mort es pot entendre com a un mecanisme d'obtenció d'energia i supervivència cel·lular (Lum, Bauer et al. 2005). Tot i així, hi han múltiples evidències de mort cel·lular autofàgica en el context tumoral (Bursch, Ellinger et al. 1996; Saeki, Yuo et al. 2000). La NCCD insta a utilitzar aquest terme inhibint moduladors bioquímics claus per aquesta mort (Figura 110).



**Figura 110. Mort cel·lular autofàgica.** La mort autofàgica caracteritzada per la vacuolització citoplasmàtica succeeix en resposta a condicions d'estrès cel·lular o durant el desenvolupament. L'execució d'aquest procés cel·lular pot estar associat al manteniment de la supervivència cel·lular (a) o consolidar-se com a procés de mort cel·lular (b). Tant en un procés com en l'altre, diversos moduladors bioquímics són determinants en l'execució de l'autofàgia com ara la proteïna Vps34 (*vacuolar protein sorting*) com a reclutadora de proteïnes vacuolars i altres moduladors autofàgics essencials per la constitució de les vesícules tals com AMBRA1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), ATG5, ATG12 i Beclin1 (adaptat de (Galluzzi, Vitale et al. 2012)).

**3) Anoikis.** Anoikis es defineix com a una mort apoptòtica produïda a causa de la pèrdua d'adhesió en cèl·lules adherents amb altre cèl·lules del teixit o amb la matriu extracel·lular. La NCCD especifica aquesta variant de mort apoptòtica únicament per les cèl·lules adherents i l'associa bioquímicament amb un defecte funcional de la integrina  $\beta 1$ , una reducció de l'expressió del receptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*), una inhibició de la via de senyalització d'ERK1 (*extracellular-related kinase 1*) i un increment dels nivells d'expressió de la proteïna pro-apoptòtica Bim (Reginato, Mills et al. 2003). Esmenta també que en la majoria de casos de mort cel·lular iniciada per anoikis, la maquinària molecular que s'executa és la de la via intrínseca.

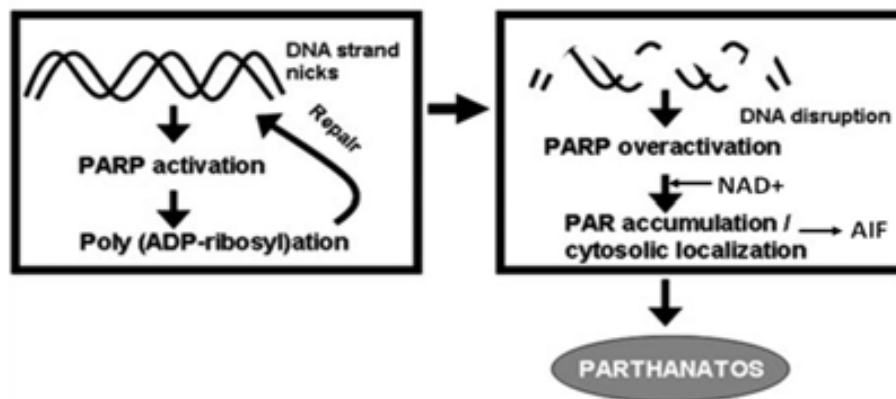
**4) Entosi.** El concepte d'entosi s'introduí per definir una modalitat de mort cel·lular no apoptòtica iniciada per un procés inusual que implicava la invasió d'una cèl·lula dins d'una altra descrit sota el terme descriptiu de "*cell-in-cell*" (com a "cèl·lula dins cèl·lula") (Figura I11). Aquest procés s'observà amb freqüència en cèl·lules no fagocítiques en mostres de tumors clínics. Entosi també es va descriure com a un procés de mort cel·lular provocat per la pèrdua d'interaccions amb la matriu extracel·lular, però s'acabà diferenciant d'anoikis per la no activació d'executors apoptòtics (Overholtzer, Mailleux et al. 2007). Els requisits de la definició d'aquesta mort per la NCCD són la degradació lisosomal i el fenomen d'internalització *cell-in-cell*, els quals són insensibles als inhibidors apoptòtics (Galluzzi, Vitale et al. 2012).



**Figura I11. Etapes del procés de mort cel·lular per entosi.** La cèl·lula invasora (blava) envaeix (indicat per una fletxa) una cèl·lula veïna (verda) per un mecanisme dependent de la proteïna Rho i requerint unions adherents (blau fosc) a la superfície de la cèl·lula envaïda. La cèl·lula invasora s'internalitza pel fenomen "*cell-in-cell*" i posteriorment es pot degradar via lisosomal (cèl·lula vermella), patir divisió cel·lular (a baix a la dreta) dintre de la cèl·lula hoste o bé alliberar-se (a baix a l'esquerra) (modificat de (Yuan and Kroemer 2010)).

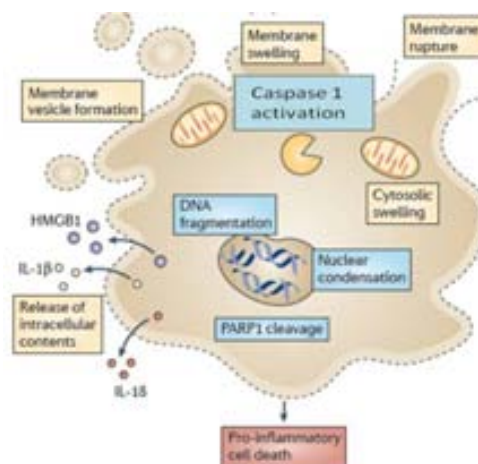
**5) Catàstrofe mitòtica.** La mort per catàstrofe mitòtica fa referència als casos de mort cel·lular desencadenats per una mitosi aberrant i s'executa durant la mitosi o en la posterior interfase. Les cèl·lules que han patit aquest tipus de mort cel·lular es caracteritzen per mostrar alteracions nuclears com la formació de micronuclis o micronucleació i la multinucleació, les quals s'empren com a marcadors morfològics per la detecció d'aquesta mort. La formació dels micronuclis s'indueix per irregularitats en el procés de divisió cel·lular que acaben generant petites estructures derivades del nucli amb cromosomes sencers o fragments cromosòmics fruit de trencaments no reparats. Per altra banda, la multinucleació s'associa a una separació cromosòmica deficient durant la citoquinesi. No obstant, s'han arribat a detectar trets morfològics tant apoptòtics com necròtics de forma concomitant o posterior a la multinucleació i inclús, s'ha associat a les aberracions mitòtiques d'aquesta mort la inducció de senescència (Vakifahmetoglu, Olsson et al. 2008; Eom, Kim et al. 2005). Pel que fa als moduladors bioquímics s'esmenta per alguns casos l'activació de caspasa-2 i la del supressor tumoral p53 (Vakifahmetoglu, Olsson et al. 2008; Sedic, Poznic et al. 2008).

**6) Parthanatos.** Aquest terme s'introdueix per definir una mort que implica les ADN polimerases PARPs (*DNA damage-responsive enzymes poly(ADP-ribose) polymerases*) i en particular la de PARP1. La NCCD pretén que aquest terme s'utilitzi per definir aquells casos de mort cel·lular que es caracteritzin per una activació temprana de PARP1 i una depleció d'ATP concomitant a una degradació de l'ADN induïda per AIF (Figura 112). Remarquen també que aquesta modalitat de mort és independent de caspases i que possiblement representi juntament amb la necroptosi un altre cas específic de necrosi regulada (Galluzzi, Vitale et al. 2012).



**Figura 112. Esdeveniments cel·lulars del procés de mort Parthanatos.** A l'esquerra, en condicions de reparació de dany a l'ADN PARP s'activa. A la dreta, si el dany és excessiu i acaba implicant una sobreactivació de l'ADN polimerasa, es condueix al fenomen de mort cel·lular de Parthanatos. La citotoxicitat es dona pel cúmul citoplasmàtic de la proteïna PAR (*poly(ADP-ribose)*) i per la depleció del cofactor NAD<sup>+</sup> (*nicotinamide adenine dinucleotide*) utilitzat en l'activació de PARP. La baixada de NAD<sup>+</sup> porta al seu torn a una depleció d'ATP, i el cúmul citosòlic de PAR té efectes tòxics mitocondrials amb la inducció de l'alliberament del factor mitocondrial AIF (modificat de (Andrabi, Dawson et al. 2008)).

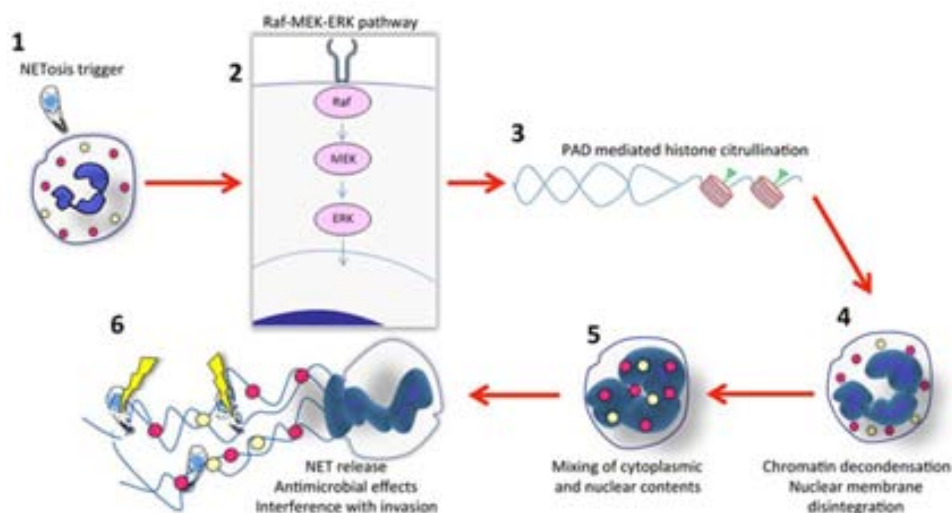
**7) Piroptosi.** La piroptosi és una forma de mort cel·lular inflamatòria desencadenada per agents patògens i principalment desencadenada en els macròfags (Galluzzi, Vitale et al. 2012). La NCCD manté la definició de piroptosi com a una mort cel·lular dependent exclusivament de caspasa-1 i associada a la producció de les interleukines IL-1 $\beta$  i IL-18 (Figura 113).



**Figura 113. Mecanismes cel·lulars associats a la mort inflamatòria de la piroptosi.** La constitució d'un complex proteic anomenat piroptosoma permet el reclutament i activació de la caspasa inflamatòria caspasa-1. L'activació d'aquesta caspasa s'associa a la secreció de mediadors de inflamatoris com HMGB1 (*high mobility group box 1*) i les interleukines IL-1 $\beta$  i IL-18. PARP1 també es processa de forma concomitant a l'activació de caspasa-1 en la mort inflamatòria. S'hi han associat trets morfològics tant apoptòtics, com ara la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN i la condensació de la cromatina; com necròtics, tals com l'inflament cel·lular, el trencament de la membrana plasmàtica, la formació de vesícules membranals i el final alliberament del contingut cel·lular (modificat de (Lamkanfi 2011)).

**8) Cornificació.** El terme de cornificació s'introdueix per definir la mort fisiològica a la què estan sotmeses contínuament les cèl·lules de la capa més externa de l'epidermis. Aquesta capa anomenada capa còrnea de l'epidermis es constitueix pels queratinòcits morts anomenats "corneòcits". La cornificació també coneguda com a "queratinització" també es considera un programa de diferenciació terminal similar al què realitzen altres tipus cel·lulars en la seva maduració a cèl·lules sense nuclis, com ara les cèl·lules de l'epiteli del cristal·lí o els glòbuls vermells. Bioquímicament, la cornificació s'associa a l'activació de la caspasa-14, a la síntesi d'enzims com les transglutaminases (TG) per la catalització de reaccions d'entrecreuament proteic i altres proteïnes específiques que actuen com a substrats. Els lípids també són presents en el procés cel·lular de cornificació quedant exclosos a l'espai extracel·lular i unint-se covalentment a proteïnes de la capa de la còrnia per tal d'assegurar la impermeabilitat de la pell. La NCCD estableix aquest procés de mort cel·lular com a una mort exclusiva dels queratinòcits funcionalment lligada a la generació de la capa de la còrnia de l'epidermis i que pot ser alterada, encara que no suprimida, mitjançant la inhibició de les TG o la deleció de la caspasa-14 (Denecker, Hoste et al. 2007).

**9) Netosi.** La netosi es defineix com a una forma de mort cel·lular detectada en cèl·lules granulocítiques tals com els neutròfils i eosinòfils. Aquest procés de mort es caracteritza per una vacuolització del citoplasma i per l'alliberació al medi extracel·lular d'unes estructures amb activitat bactericida anomenades NETs (*neutrophil extracellular traps*) (Figura I14). Tot i així, s'han detectat casos de netosi sense la formació de les estructures NETs o amb la presència d'aquestes sense arribar a induir mort cel·lular. Les característiques emprades per definir aquesta modalitat de mort són: l'exclusivitat del procés de mort cel·lular en cèl·lules granulocítiques, la insensibilitat a inhibidors de caspases i a l'inhibidor necroptòtic específic de RIP1 (necrostatina-1), així com també la dependència de l'anió superòxid generat per NADPH oxidasa (Galluzzi, Vitale et al. 2012).



**Figura I14. Mecanisme de formació de les estructures NET en la mort cel·lular de netosi.** (1) Un estímul generalment infeccios associat al paràsit *Toxoplasma* engega el procés de generació de les estructures NET. (2) L'activació de la cascada Raf-MEK-ERK així com també les NADPH oxidases (aquí no mostrat) estan implicades. (3) La senyalització cel·lular es desencadena al nucli amb l'activació de l'enzim l'enzim PAD4 (peptidylarginine deiminase 4) altament expressat en les cèl·lules granulocítiques i catalitzador de la hipercitrullinació d'histones (conversió dels residus d'arginina a citrulina). (4) En conseqüència, té lloc la descondensació de la cromatina i la disintegració de l'envolta nuclear. (5) Això té resultat en una barreja de contingut nuclear i citosòlic amb presència de grànuls (cercles grocs i vermells) que acaba constituint les estructures NET. (6) Les NET amb un ampli contingut cel·lular (cromatina descondensada, histones i proteïnes bactericides) s'alliberen al medi extracel·lular per combatre l'agent infeccios (adaptat de (Abi Abdallah and Denkers 2012)).

**10) Apoptosi independent de caspases.** L'apoptosi independent de caspases es defineix com a una modalitat de mort apoptòtica que no requereix l'activació de les caspases (aquestes s'expliquen en l'apartat 3. "Bioquímica de l'apoptosi: les caspases") i que es desencadena a partir de la sortida al citosol de factors mitocondrials pro-apoptògens tals com el factor inductor d'apoptosi AIF (*apoptosis-inducing factor*), l'endonucleasa ENDOG o el factor HtraA2/Omi (*high temperature requirement protein A2*) (aquests factors es descriuen més endavant en l'apartat 2.3.2.D. "Alliberament de factors mitocondrials pro-apoptògens").

**11) Apoptosi dependent de caspases: via extrínseca i via intrínseca.** Aquestes dues vies de mort apoptòtica s'expliquen a continuació en l'apartat següent 2.3.2. "L'apoptosi".

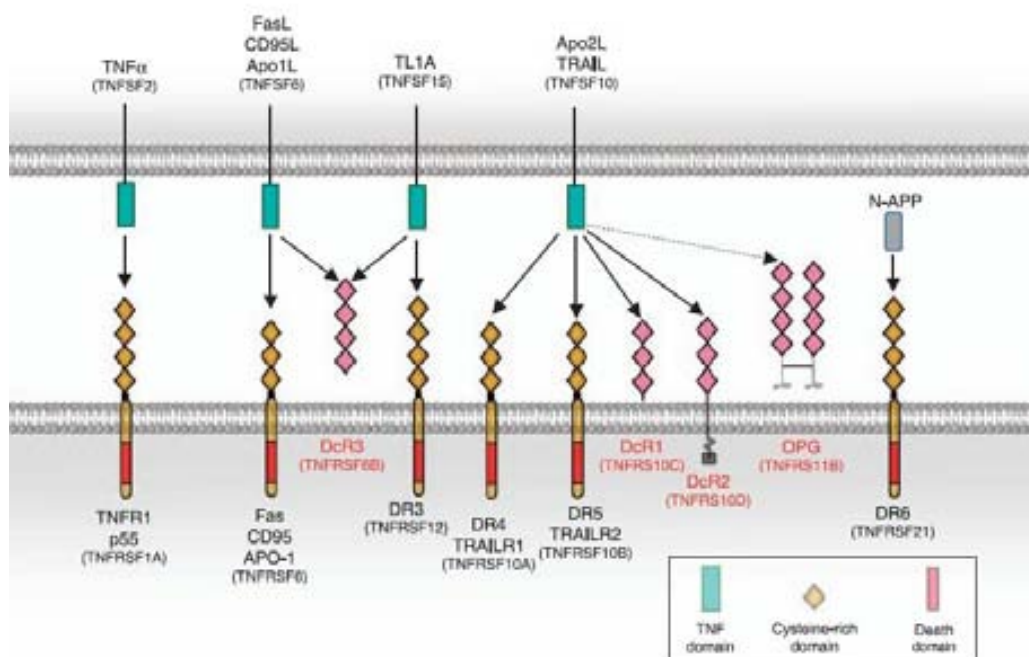
### 2.3.2. L'apoptosi

Existeixen dues vies que condueixen a la mort apoptòtica: la via extrínseca o exògena, i la via intrínseca o via mitocondrial o altrament coneguda com a via endògena. La via extrínseca s'inicia amb una senyal de mort externa mitjançant uns receptors transmembranals anomenats receptors de mort (DR de *death receptors*). En canvi, la via intrínseca s'activa per estímuls provinents de l'interior cel·lular desencadenant una senyal de mort que convergeix a la mitocondria (Joza, Kroemer et al. 2002).

Pel que fa a la via extrínseca, la transducció de la senyal apoptòtica externa es desencadena a partir de la interacció dels DR amb determinades proteïnes extracel·lulars que actuen com a lligands específics sota el terme de lligands de mort (LD de *death ligands*). Tant els diferents receptors de mort com els seus corresponents lligands, pertanyen a la súperfamília dels membres de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Figura I15). A conseqüència de la interacció entre el lligand i el DR, s'indueix una homotrimerització del receptor degut a la presència dels LD en forma d'homotrímers al medi extracel·lular (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Això condueix a l'activació del DR i a l'inici de la transducció de la senyal apoptòtica externa a la cèl·lula.

Els receptors DR presenten un domini intracel·lular en la part C-terminal que constitueix el domini de mort DD (*death domain*) determinant pel reclutament d'unes proteïnes adaptadores (Boldin, Mett et al. 1995; Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Aquestes proteïnes contenen també el domini DD i l'anomenat domini efector de mort DED (*death effector domain*). La presència del DD en les proteïnes adaptadores permet la seva interacció amb els DR i la del domini DED reclutar les caspases iniciadores en la forma inactiva de pro-caspasa (les caspases s'expliquen més endavant en l'apartat 3. "Bioquímica de l'apoptosi: les caspases"). En concret es recluten la pro-caspasa-8 o -10 que també contenen el domini DED per poder interaccionar amb les proteïnes adaptadores. El complex proteic resultant d'aquesta activació dels DR és l'anomenat DISC (*death inducing signalling complex*). La constitució del DISC és essencial pel seguiment de la transmissió de la senyal apoptòtica externa a l'interior de la cèl·lula. Cal afegir, que segons el tipus de DR les molècules adaptadores presents en la constitució del DISC són diferents. Entre les més conegudes destaquen FADD (Fas-associated DD) i TRADD (TNFR-associated DD). Els receptors Fas, DR4 i DR5 s'uneixen normalment a FADD, i TRADD es recluta en gran mesura pels receptors TNFR1, DR3 i DR6 (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995; Chaudhary, Eby et al. 1997; Hsu, Xiong et al. 1995; Lavrik, Golks et al. 2005). En el cas, però, de TRADD, aquesta no interacciona de forma directa amb les caspases iniciadores degut a que no disposa del domini DED. En conseqüència, TRADD requereix de la presència d'altres molècules adaptadores com FADD que li permetin aquesta

interacció (Micheau and Tschopp 2003). Posteriorment a la formació del DISC, la pro-caspasa iniciadora 8 o 10 s'activa per autoproteòlisi obtenint la forma activa de la caspasa com a caspasa-8 o caspasa-10 en un heterotetràmer de dues subunitats petites i dues subunitats grans. Un cop activades les caspases iniciadores, aquestes activen les caspases efectores caspasa-3, -6 i -7. L'activació de les procaspases efectores es duu a terme a través d'un processament específic just després dels seus residus d'àcid aspàrtic. Les caspases efectores acaben d'executar la senyal apoptòtica a través de l'escissió específica de múltiples substrats que permeten a la cèl·lula adquirir les diferents característiques morfològiques i bioquímiques apoptòtiques per tal de contribuir al desmantellament final cel·lular (Cryns and Yuan 1998). Les cèl·lules que desencadenen aquest tipus de senyalització apoptòtica es consideren cèl·lules de tipus I (Scaffidi, Fulda et al. 1998). No obstant, la transducció de la senyal apoptòtica extrínseca es pot amplificar a través del processament de la proteïna apoptòtica Bid per part de la caspasa-8 generant el fragment tBid (*truncated Bid*). Aquest fragment indueix una permeabilització de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (veure apartat 2.3.2.A. "La mitocondria com a orgànul clau durant l'apoptosi"). Aquest fenomen permet amplificar la senyal apoptòtica conduint a l'activació de la pro-caspasa iniciadora 9, la qual activa les caspases efectores (Figures I16 i I18). Les cèl·lules apoptòtiques que pateixen aquest darrer tipus de transducció de senyal es consideren cèl·lules de tipus II (Scaffidi, Fulda et al. 1998).

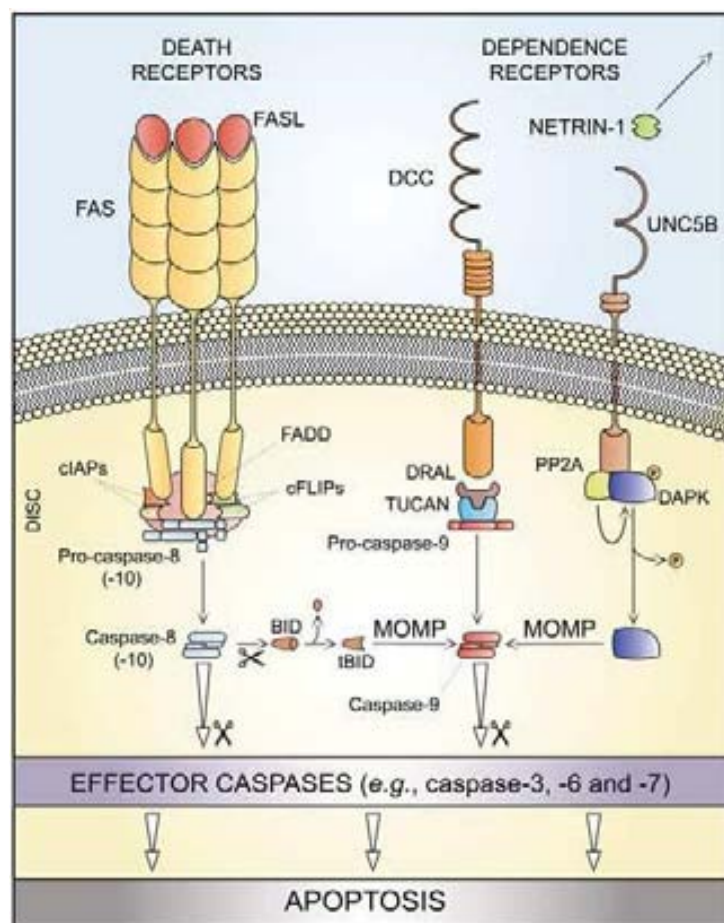


**Figura I15. Receptors de mort i els seus lligands.** En humans, s'han caracteritzat 6 receptors DR pertanyents a la superfamília TNFR: TNFR1 o TNFRSF1A, CD95 també conegut com a Fas, APO-1 o TNRSF6, DR3 o TNFRSF12, DR4 anomenat també TRAILR1 o TNFRSF10A, DR5 o altrament conegut com a TRAILR2 o TNFRSF10B, i DR6 o TNFRSF21. Els respectius lligands actualment coneguts són: TNF $\alpha$  pel receptor TNFR1, CD95 o FasL (*Fas ligand*) pel receptor CD95, TL1A o més conegut com a VEGI (*Vascular Endothelial Growth Inhibitor*) per DR3, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) per DR4 i DR5, i N-APP (*amino-terminal fragment of amyloid precursor protein*) per DR6. Els *decoy receptors* (DcRs) també hi són representats com a membres de la superfamília TNFR deficients en la inducció de la senyal apoptòtica extrínseca i competidors amb els receptors DR en la seva unió al lligand. DcR1 i DcR2 poden competir amb DR4 i DR5 per unir-se a TRAIL, com també ho fa el receptor soluble de la osteoprotegerina però amb menor afinitat. DcDR3 competeix a nivells dels lligands respectius dels receptors DR de Fas i DR3 (revisat en (Gonzalvez and Ashkenazi 2010)).

Alternativament, la senyal apoptòtica extrínseca també es pot internalitzar a través dels anomenats "receptors dependents" (Figura I16). Entre aquests destaquen els receptors de netrina



com els receptors UNC5A-D i DCC (*deleted in colorectal carcinoma*). Aquests receptors desencadenen només una senyalització letal en absència del seu lligand de netrina-1 o bé, quan la concentració d'aquest està per sota d'un determinat llindar que la cèl·lula considera crític (Llambi, Causeret et al. 2001). En el cas del receptor DCC, la transducció de la senyal apoptòtica extrínseca es desencadena a través de la proteïna adaptadora DRAL. Aquesta recluta a proteïnes com TUCAN o NALP1 que per mitjà del seu domini CARD interaccionen amb la pro-caspasa-9 (Mille, Thibert et al. 2009). La constitució d'aquest complex proteic permet l'activació de la caspasa-9, la qual activa les caspases efectores. Pel que fa al receptor UNC5B, aquest desencadena la seva senyal a través de la fosfatasa PP2A (*protein phosphatase 2A*), la qual defosforila i activa la quinasa DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) (Guenebeaud, Goldschneider et al. 2010) (Guenebeaud, Goldschneider et al. 2010). L'activació de DAPK1 s'ha associat a l'activació de les caspases efectores de forma directa o a través de la permeabilització de la membrana externa mitocondrial (Figura I16).

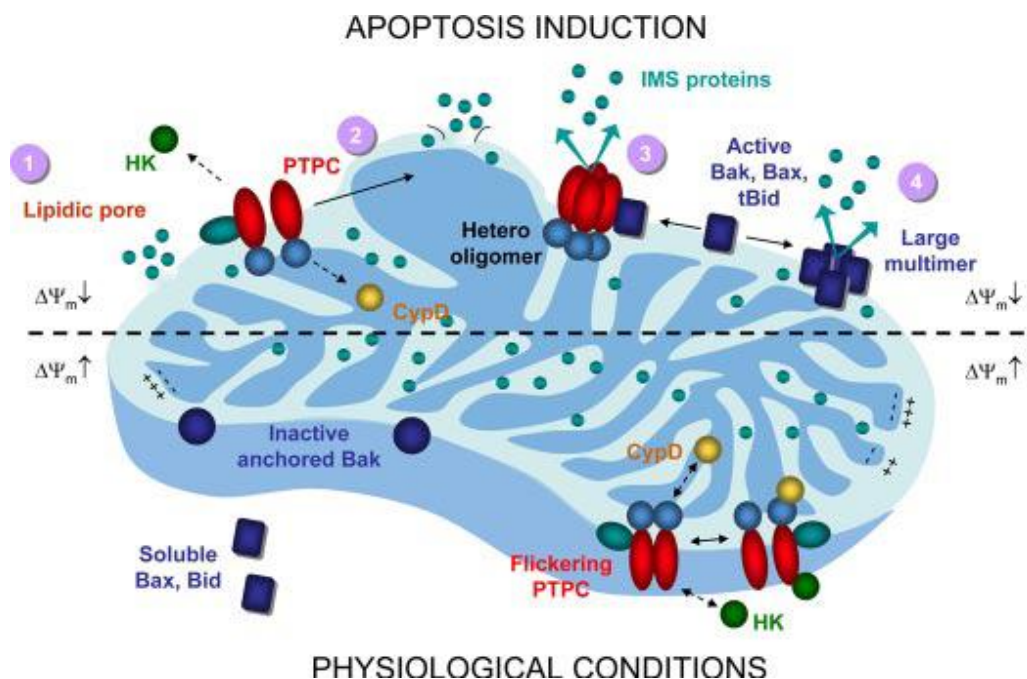


**Figura I16. Receptors de la via extrínseca: receptors de mort i receptors dependents.** Es mostra el receptor de Fas com a exemple de via extrínseca apoptòtica iniciada per un receptor DR i els receptors DCC i UNC5B com a exemples de receptors dependents iniciadors també de la via extrínseca apoptòtica (revisat en (Galluzzi, Vitale et al. 2012)).

Pel que fa a la via intrínseca o mitocondrial, aquesta es desencadena igual que l'apoptosi extrínseca però sense la implicació dels receptors de mort i els receptors dependents. La maquinària cel·lular és la mateixa que la via extrínseca però a partir dels mecanismes de senyalització que s'inicien en la mitocondria (Figura I18). La via intrínseca s'anirà explicant més en detall al llarg d'aquest apartat.

2.3.2.A. La mitocondria com a orgàdul clau durant l'apoptosi

La implicació de les mitocondries en la regulació de l'apoptosi es reconegué per la detecció de canvis funcionals de l'orgàdul en les etapes inicials de l'apoptosi (Vayssiere, Petit et al. 1994). Són diverses les senyals internes de mort cel·lular que poden desencadenar l'inici de la via intrínseca. En concret, la senyalització interna que arriba a la mitocondria s'associa a estrès o citotoxicitat cel·lular i consisteix en estímuls intrínsecs tals com el dany a l'ADN, estrès oxidatiu, sobrecàrrega de calci citosòlica, estrès reticular o, inclús, l'acció de fàrmacs quimioterapèutics. En conseqüència, es desencadena el fenomen de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa, el qual permet iniciar la propagació de la senyal apoptòtica intrínseca a la cèl·lula (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

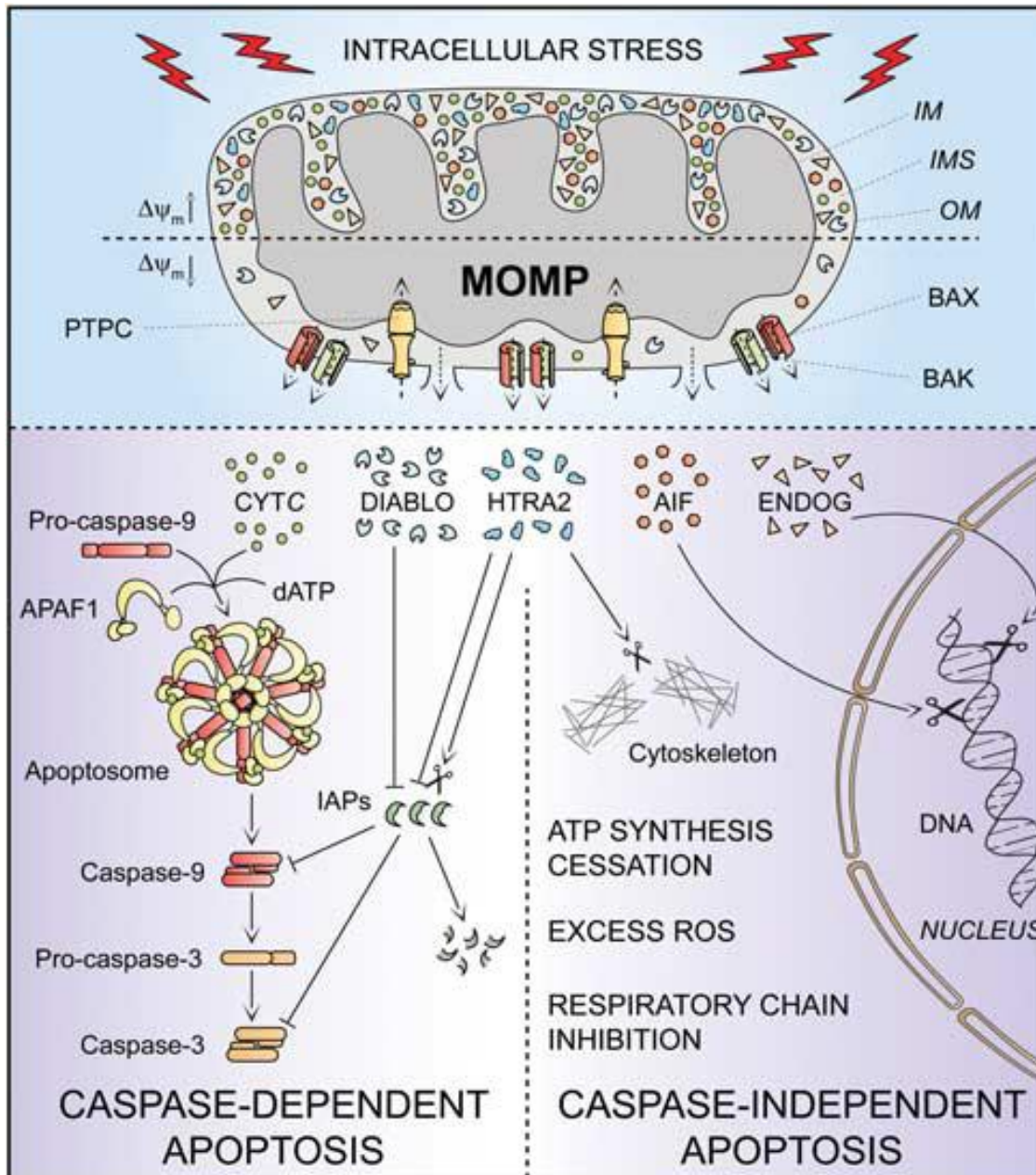


**Figura I17. Mecanismes bioquímics de permeabilització de la membrana externa mitocondrial en la inducció de la via intrínseca.** En condicions fisiològiques, la mitocondria mostra un alt potencial transmembranal mitocondrial, manté les proteïnes pro-apoptòtiques de la família Bcl-2 en el seu estat inactiu (solubles al citosol en el cas de les proteïnes Bax i Bid o ancorades a la membrana mitocondrial externa en el cas de Bak) i el porus o megacanal mtiocndrial PTPC (*permeability transition pore complex*) executa l'intercanvi de metabòlits entre el citosol i la matriu mitocondrial a partir del seu "parpalleig" (flickering) estrictament regulat. En l'estat fisiològic també, l'enzim citosòlic de la hexoquinasa (HK) i la proteïna ciclofilina D (CypD) inhibeixen per interacció el complex PTPC en el seu estat transitori d'obertura a la inducció de la permeabilització de la membrana externa mitocondrial. Conseqüentment, en condicions apoptòtiques aquest fenomen porta a l'alliberament de les proteïnes de l'espai intermembranal mitocondrial (IMS) al citosol per la final execució de l'apoptosi intrínseca. La permeabilització mitocondrial pot succeir per diverses vies. (1) Desestabilització lipídica de la membrana mitocondrial amb la conseqüent formació de porus. (2) Obertura permanent de PTPC associat a la seva pèrdua d'interaccions amb HK i CypD seguit per l'inici d'una pèrdua del potencial transmembranal mitocondrial i un desequilibri osmòtic que porta al inflament de la matriu mitocondrial. Degut a una major superfície de la membrana interna mitocondrial a la de la membrana externa, l'inflament mitocondrial acaba amb la ruptura de la membrana mitocondrial externa. (3) Membres pro-apoptòtics de la família Bcl-2 són activats i translocats del citosol a la membrana externa i pateixen canvis conformacionals per interaccionar amb components de PTPC. (4) Les proteïnes po-apoptòtiques de la família Bcl-2 també poden alternativament oligomeritzar-se directament a la membrana externa mitocondrial (adaptat de (Kroemer, Galluzzi et al. 2007)).

Existeixen múltiples mecanismes de permeabilització de la membrana externa mitocondrial (Figura I17). No obstant, independentment dels mecanismes bioquímics de permeabilització, aquest fenomen és irreversible i es desencadenen el mateix tipus de conseqüències letals per la cèl·lula. La més important és l'alliberament de proteïnes pro-apoptòtiques des de l'espai

intermembranal mitocondrial al citosol (Patterson, Spahr et al. 2000). Les proteïnes pro-apoptòtiques que es poden alliberar al citosol són: el transportador d'electrons citocrom C (CytC), SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) o altrament anomenada DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*), els quals promouen l'activació de les caspases; el factor inductor d'apoptosi AIF (*apoptosis-inducing factor*) o l'endonucleasa G (ENDO G), que actuen principalment de forma independent a les caspases; o el factor HTRA2 o Omi (*high temperature requirement protein A2*) que també pot promoure l'activació de les caspases o bé, actuar de forma independent a aquestes (Van Loo, Demol et al. 2002; Verhagen, Ekert et al. 2000; Susin, Lorenzo et al. 1999; Li, Luo et al. 2001; Verhagen, Silke et al. 2002). L'activació de les caspases en el cas de citocrom c s'aconsegueix a través de la constitució del complex proteic anomenat apoptosoma, mentre que SMAC/DIABLO i HTRA2/Omi, la indueixen per mitjà de la inhibició de les anomenades proteïnes inhibidores d'apoptosi IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*) (Li, Nijhawan et al. 1997; Chai, Du et al. 2000; Du, Fang et al. 2000; Yang, Church-Hajduk et al. 2003; Srinivasula, Gupta et al. 2003) (Figura I18). Tots aquests factors mitocondrials s'expliquen més en detall en l'apartat 2.3.2.D. "Alliberament de factors mitocondrials pro-apotogènics".

Per altra banda, destaquen altres esdeveniments cel·lulars que es desencadenen a partir de la permeabilització de la membrana externa mitocondrial com ara: la disminució del potencial transmembranal mitocondrial, l'aturada de síntesi d'ATP i la inhibició del transport electrònic mitocondrial. Aquesta última resulta en una sobreproducció de ROS que afavoreix l'actuació dels processos d'estrès oxidatiu com a estímul intrínsec mitocondrial (Ricci, Munoz-Pinedo et al. 2004).



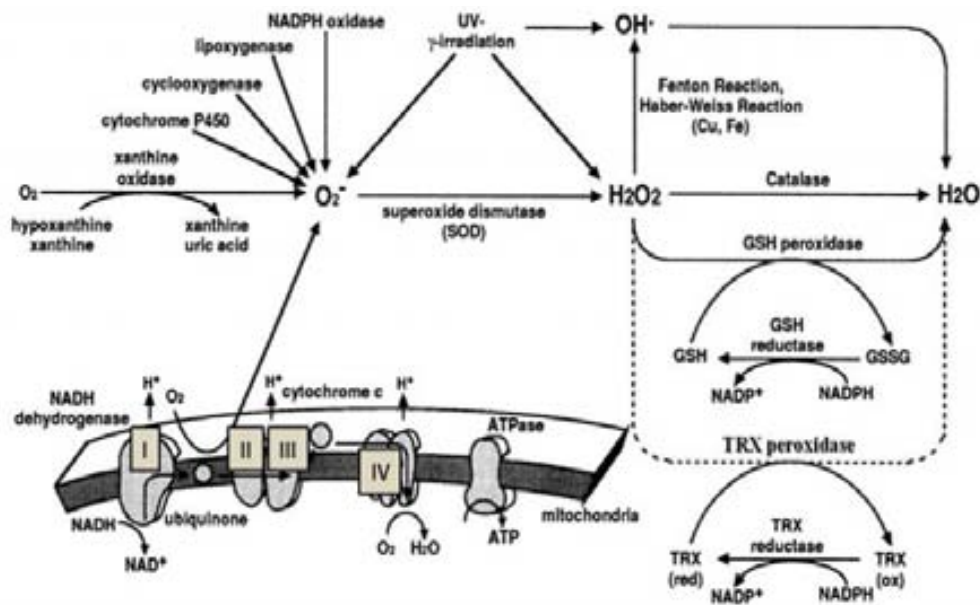
**Figura 118. Model de la via intrínseca.** En resposta a condicions d'estrès intracel·lular, es genera una senyal de mort que convergeix a la mitocondria i desencadena el fenomen de permeabilització de la membrana externa mitocondrial (MOMP). En conseqüència, tenen lloc diferents esdeveniments cel·lulars com la pèrdua del potencial transmembranal mitocondrial, l'aturada de síntesi d'ATP, el desacoblament de la cadena respiratòria amb la conseqüent generació de ROS i en últim grau, l'alliberament al citosol de les proteïnes contingudes a l'espai intermembranal mitocondrial (IMS). Entre aquestes, citocrom c (Cyt C) juntament amb la proteïna APAF1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), la molècula dATP i la pro-caspasa 9 constitueixen el complex proteic apoptosoma per desencadenar l'activació de caspasa-9. Caspasa-9 activa a caspasa-3 i s'amplifica, així, la cascada proteolítica de caspases efectores. SMAC/DIABLO i HTRA2/Omi aconseguen l'activació de caspases per la interacció i/o degradació de les IAPs. AIF i ENDOG actuen de forma caspasa independent i migren al nucli per induir la fragmentació de l'ADN. HTRA2/Omi també pot contribuir en l'apoptosi intrínseca independent de caspases a través del processament de diverses proteïnes del citoesquelet (adaptat de Galluzzi, Vitale et al. 2012)).

## 2.3.2.B. Senyals apoptòtiques intrínseques

### 2.3.2.B.1. Estrès oxidatiu

#### 2.3.2.B.1.1. Generalitats

El fenomen cel·lular d'estrès oxidatiu es desencadena per un desequilibri a favor de l'excessiva producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), davant la incapacitat del sistema biològic per realitzar una detoxificació cel·lular eficient d'aquestes molècules. Els ROS tal i com el seu nom original indica (*reactive oxygen species*) inclouen totes aquelles molècules derivades del metabolisme de l'oxigen altament reactives pel seu estat químic intermediari oxidant. La susceptibilitat de reacció d'aquestes espècies fa que fàcilment esdevinguin un mecanisme de toxicitat cel·lular (Fridovich 1978; Orrenius 2007). La majoria dels ROS són productes de la cadena respiratòria mitocondrial. Malgrat el transport electrònic mitocondrial és altament eficient, el 1-2% d'electrons poden en una reducció incompleta de l'oxigen generar l'espècie reactiva de l'anió superòxid ( $O_2^-$ ). La fallada del transport electrònic es detecta principalment a nivell dels complexos mitocondrials I i III (Liu, Fiskum et al. 2002; Wei, Scholes et al. 1981). No obstant, la mitocondria no és l'únic orgànu associat a la producció de ROS, l'anió superòxid també es pot generar en un ineficient transport electrònic de la membrana nuclear i del reticle endoplasmàtic. La generació d' $O_2^-$  extramitocondrial, però, no s'indueix únicament des d'un transport electrònic. Múltiples enzims també s'associen a la producció d' $O_2^-$  no mitocondrial. La proteïna transmembranal NADPH oxidasa o més coneguda com a Nox i els enzims de la família P450 localitzats preferentment en zones pròximes al reticle endoplasmàtic, són alguns dels exemples d'altres fonts productores d' $O_2^-$  no mitocondrials. Per altra banda,  $O_2^-$  també es pot produir a partir d'alguns processos bioquímics com el metabolisme oxidatiu de l'àcid araquidònic a través de les seves vies enzimàtiques de lipoxigenasa i ciclooxigenasa (Cross and Jones 1991). No obstant, els ROS també inclouen altres espècies reactives oxidants tals com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i l'anió hidroxil ( $OH^-$ ). La principal font de  $H_2O_2$  descrita s'obté a partir de l'acció de l'enzim superòxid dismutasa (SOD), el qual genera  $H_2O_2$  utilitzant l'anió superòxid com a substrate. En canvi, el radical hidroxil es genera a través de les reaccions de Haber-Weiss i Fenton catalitzades pels ions de coure i ferro (Figura I19). No obstant, l'anió superòxid i el peròxid d'hidrogen tenen menor reactivitat química que el radical hidroxil. Inclús, alguns autors en certes patologies consideren aquest radical com al responsable directe de la major part del dany oxidatiu (Halliwell, Gutteridge et al. 1985).



**Figura I19. Mecanismes cel·lulars de generació de radicals oxidants.** Les espècies reactives de l'oxigen tals com  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  i  $OH^\cdot$ , es generen en les cèl·lules per diferents mecanismes.  $O_2^-$  es pot generar a la mitocondria per una pèrdua d'electrons en la cadena del transport electrònic mitocondrial o per enzims no mitocondrials com la NADPH citocrom P450 reductasa, la hipoxantina o xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la lipoxigenasa o la ciclooxigenasa.  $O_2^-$  es pot convertir a  $H_2O_2$  per l'enzim superòxid dismutasa.  $H_2O_2$  es redueix a  $H_2O$  a través dels enzims de detoxificació cel·lular com la catalasa, la glutatió (GSH) peroxidasa i la tioredoxina (TRX) peroxidasa. GSH reductasa i TRX reductasa en presència del cofactor NADPH permeten regenerar la forma reduïda de GSH (GSH) a partir de la forma oxidada (GSSG), i la forma reduïda de TRX (TRX (red)) a partir de la forma oxidada (TRX (ox)) respectivament.  $H_2O_2$  també pot produir el radical  $OH^\cdot$  a través de les reaccions de Fenton i Haber-Weiss. Les radiacions  $\gamma$  i ultravioleta (UV) són també capaces d'induir a la formació de totes aquestes espècies reactives de l'oxigen (modificat de (Kamata and Hirata 1999)).

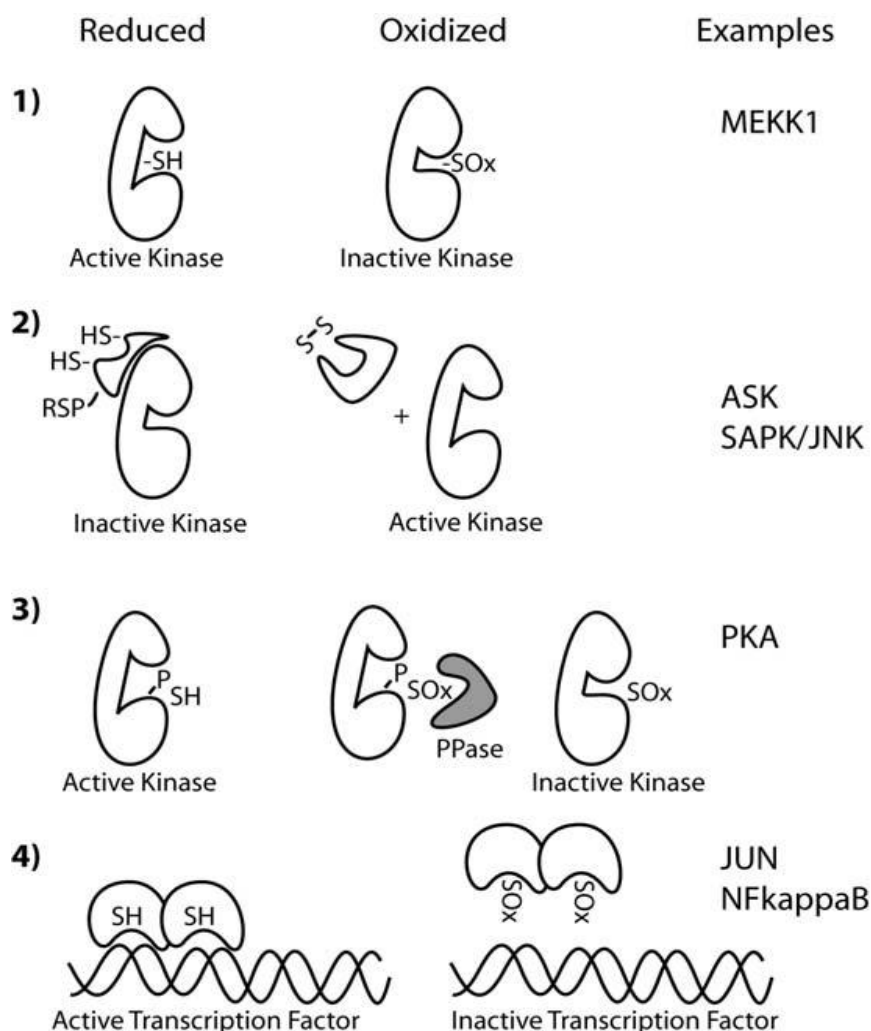
### 2.3.2.B.1.2. Citotoxicitat cel·lular: oxidació de proteïnes, lípids i ADN

El dany cel·lular desencadenat per la sobreproducció de ROS en el fenomen d'estrès oxidatiu inclou principalment l'oxidació de proteïnes, lípids i ADN.

La principal diàlisi oxidativa de les proteïnes són els grups tiols (R-SH) presents en els residus de cisteïna. En condicions d'estrès oxidatiu, l'oxidació no controlada d'aquests grups esdevé un mecanisme rellevant de citotoxicitat cel·lular, donat que el seu estat redox és determinant en la regulació de múltiples funcions de senyalització. L'alteració d'aquestes funcions per acció dels ROS en proteïnes es pot desencadenar per diferents vies: oxidacions directes en residus de cisteïna del centre actiu, formació de ponts disulfur intra o intermoleculars entre les diferents formes oxidatives, sovint donant lloc a processos d'agregació proteica, o bé oxidacions de cisteïnes distants del centre actiu però determinants en la regulació d'un mecanisme d'activació al·lostèric (Figura I20). No obstant, l'oxidació dels grups tiols de les cisteïnes es pot revertir per agents reductors tals com el DTT (*dithiothreitol*) i el GSH (*glutathione*). Oxidacions, però, addicionals a l'inicial grup tiolat de les cisteïnes són irreversibles, pel que aquestes proteïnes poden esdevenir definitivament inactives inclús en un ambient reduït (Giles, Tasker et al. 2001).

D'altra banda, els ROS també poden reaccionar amb el grup funcional tioèster (R-S-R) present als residus de metionina. La modificació funcional oxidativa per aquest residu és reversible i pot afectar a l'activitat biològica de la proteïna (Carp, Miller et al. 1982).

Els lípids poden patir també oxidació en l'anomenat procés de peroxidació lipídica, el qual danya les membranes cel·lulars (Figura I24). Les principals dianes són els àcids grassos poliinsaturats per la presència de múltiples dobles enllaços susceptibles de reaccionar amb els radicals lliures oxidants (Novo and Parola 2008).



**Figura I20. Exemples de mecanismes de modulació oxidativa funcional en proteïnes de senyalització.** Es mostren diferents exemples de mecanismes d'oxidació dels residus de cisteïna en proteïnes de senyalització determinant el seu estat final d'activitat segons si l'ambient cel·lular és reduït o oxidat. 1) MEKK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*), pateix una oxidació del grup tiol (-SH) d'un residu de cisteïna en el domini d'unió a ATP. La seva oxidació (-SOx) interfereix en l'activitat de la quinasa. 2) L'activitat quinasa és inhibida a través de la interacció amb proteïnes sensibles a un ambient oxidatiu. L'oxidació d'aquestes proteïnes inhibidores permet la dissociació del complex i la final activació de la quinasa, sent el cas de les quinases ASK (*apoptosis signaling kinase*) i SAPK/JNK (*stress activated protein kinase*) (*jun N-terminal kinase*). 3) L'oxidació d'un residu de cisteïna a prop del lloc fosforilació (-P) de la proteïna incrementa la susceptibilitat de reacció de les fosfatases (PPase) portant a la inactivació de la proteïna PKA (*protein kinase A*). 4) Factors de transcripció inactius deguts a una oxidació de residus de cisteïna en els seus dominis d'unió a l'ADN (font: (Cross and Templeton 2006)).

El dany oxidatiu més agressiu, però, és en l'ADN. Els ROS són potencialment mutagènics degut a la seva alta reactivitat amb aquesta molècula biològica. El radical hidroxil és la principal espècie reactiva oxidativa per l'ADN i les seves alteracions inclouen des de trencaments de l'ADN i addició de dobles enllaços, a oxidacions de les purines i pirimidines i unions irreversibles entre l'ADN i les proteïnes. L'ADN en replicació és el més vulnerable a l'oxidació, donada la seva

manca de protecció amb les histones i el seu menor estat de compactació. En aquest sentit, la toxicitat dels ROS és major en aquells tipus cel·lulars amb una taxa proliferativa més alta. Si el dany oxidatiu de l'ADN no es repara, s'afavorirà a la mutagènesi i a la inestabilitat genètica podent donar lloc a processos cancerígens (Dizdaroglu 2012). Per altra banda, l'ADN mitocondrial també és bastant susceptible al dany oxidatiu, donada la manca d'una protecció proteica i la seva proximitat a la cadena de transport electrònic (Orrenius 2007).

### 2.3.2.B.1.3. Mecanismes d'activació de la via intrínseca per ROS

Els ROS són una de les principals senyals d'estrès mitocondrial claus en la inducció de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa a través de l'obertura del porus de permeabilitat mitocondrial PTPC (*permeability transition pore complex*). Diferents mecanismes s'associen a l'obertura del megacanal a través de ROS. El més rellevant és l'oxidació de tiols del translocador ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), la qual genera reaccions d'entrecreuament (*cross-linking*) d'aquests grups. El translocador acaba patint canvis conformacionals que porten a una conseqüent obertura del megacanal (Costantini, Belzacq et al. 2000). Altres oxidacions en els grups tiols de proteïnes de membrana mitocondrials també poden induir l'obertura del porus PTPC. En conseqüència, la permeabilització mitocondrial induïda per ROS es pot evitar per agents reductors tals com el DTT (Fagian, Pereira-da-Silva et al. 1990; Valle, Fagian et al. 1993).

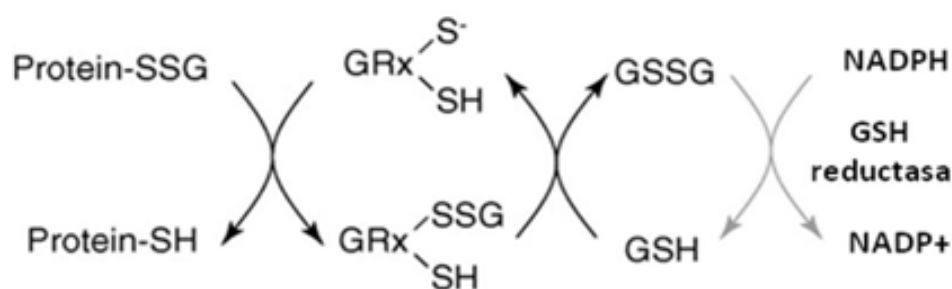
D'altra banda, els ROS poden induir la permeabilització mitocondrial a través de l'oxidació directa de molècules com el donador d'electrons NADPH, clau en l'execució de la respiració mitocondrial, o bé de les proteïnes mitocondrials aconitases. La inactivació oxidativa d'aquestes proteïnes de sulfur de ferro (Fe-S) s'associa a un alliberament de ferro i peròxid d'hidrogen, els quals són favorables per la generació del radical hidroxil mitjançant la reacció de Haber-Weiss i Fenton (Orrenius 2007). El radical hidroxil amb capacitat també oxidativa dels grups tiols de les proteïnes del porus, pot promoure, a més, la permeabilització de la membrana mitocondrial a través de la peroxidació lipídica (Chen, Bertrand et al. 1995). Modificacions oxidatives de l'ambient lipídic mitocondrial poden activar la via intrínseca a través de la inducció directa de l'alliberament de citocrom c. L'oxidació de la cardiolipina, lípid de la membrana interna mitocondrial i al qual normalment citocrom c s'hi troba unit, porta al trencament de les seves interaccions. En conseqüència, citocrom c s'acaba alliberant a través de porus lipídics mitocondrials creats per la desestabilització oxidativa de la membrana externa (Kagan, Tyurin et al. 2005). Per últim, la permeabilització de la membrana mitocondrial també es pot afavorir per l'oxidació directa de l'ADN mitocondrial. Aquesta, en conseqüència, afecta a la síntesi de proteïnes essencials pel transport electrònic i a la generació d'ATP (Orrenius 2007).

### 2.3.2.B.1.4. Processos de detoxificació cel·lular

El sistema antioxidant de la cèl·lula es constitueix tant per mecanismes enzimàtics com per molècules no enzimàtiques. Sistemes enzimàtics com la catalasa, la superòxid dismutasa (SOD), la glutatió peroxidasa (Gpx) i la tioredoxina peroxidasa (TPx), són determinants en la directa detoxificació de ROS (Figura I19). La conversió de l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen per SOD pot ser seguida de l'acció antioxidant dels altres enzims. El peròxid d'hidrogen pot ser llavors neutralitzat en forma d'aigua per qualsevol dels altres enzims. Les molècules no enzimàtiques també tenen un paper determinant en la detoxificació cel·lular de ROS. Entre aquestes destaquen el glutatió (GSH) i molècules amb també caràcter antioxidant com les vitamines C i E.

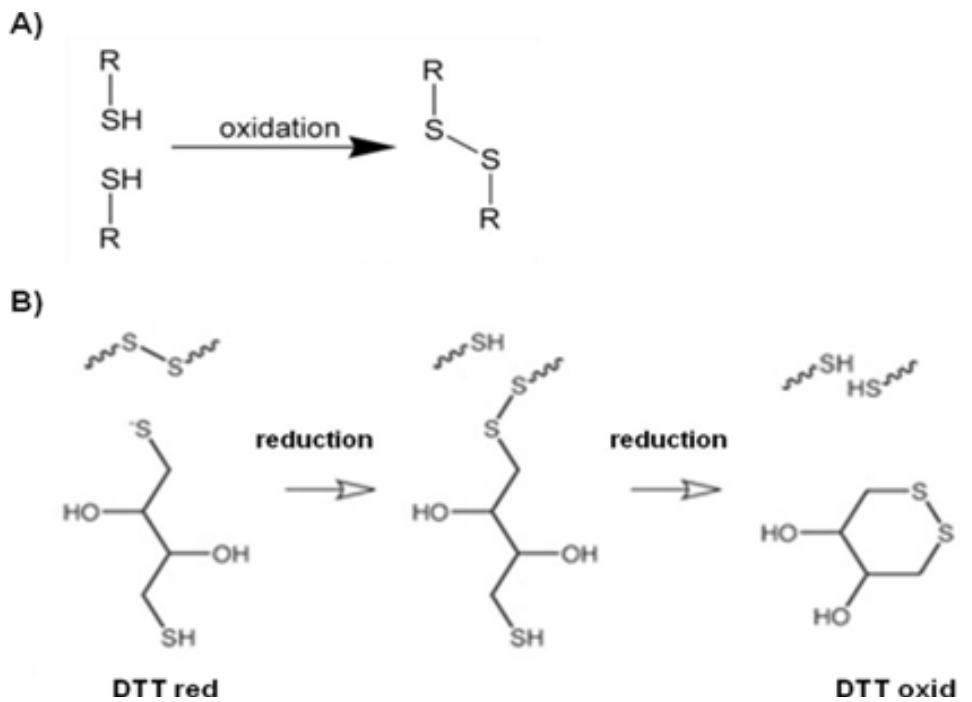


GSH (*L*- $\gamma$ -glutamyl-*L*-cysteinyl-glycine), com a tripèptid constituït pels residus de glicina, cisteïna i glutamat, és la principal defensa no enzimàtica de la cèl·lula, ja que hi és present en concentracions de l'ordre milimolar. La seva acció antioxidant es realitza principalment a la mitocondria, on es transporta després de la seva síntesi citosòlica. La funció, però, més rellevant d'aquesta molècula, és el manteniment dels grups tiols de les proteïnes en presència de les espècies reactives de l'oxigen. GSH pot formar ponts disulfur reversibles amb les proteïnes constituint, així, ponts disulfur mixtes (proteïna-SSG) en l'anomenada reacció de glutatiónilització o glutatiolació (Figura I21). L'addició de la molècula reductora en aquesta reacció és el principal mecanisme de detoxificació del GSH, donat que evita modificacions oxidatives irreversibles dels grups tiols en condicions d'estrès oxidatiu intens. A més a més, GSH és també determinant en la reducció de la glutaredoxina (Grx), el responsable bioquímic de revertir la glutatiónilització i, per tant, essencial en la recuperació de l'estat proteic inicial superat l'estímul del dany oxidatiu (Gallogly and Mieyal 2007). La forma reduïda de GSH (GSH), però, també és substrat en la reacció de detoxificació de directa de peròxid d'hidrogen executada per la GSH peroxidasa (Figura I20). Aquesta reacció implica la producció de la forma oxidada del glutatió GSSG, pel que una ratio baixa de l GSH/GSSG serveix d'indicador d'estrès oxidatiu (Schafer and Buettner 2001). Per tant, la regeneració de la forma reduïda del GSH s'exigeix per l'òptim manteniment del mecanisme de detoxificació. En aquest sentit, els nivells de GSH es poden recuperar de nou a través de la GSH reductasa utilitzant NADPH com a cofactor (Figura I19 i I21).



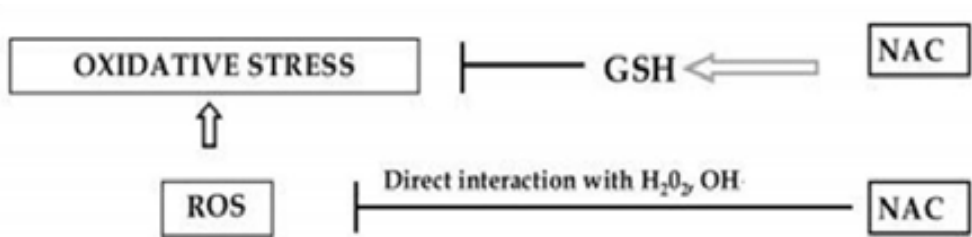
**Figura I21. Mecanisme de desglutacionilització i regeneració antioxidant del GSH en proteïnes.** La proteïna glutatiónilitzada per GSH (proteïna-SSG) recupera el seu estat inicial tiòlic (proteïna-SH) reaccionant amb la forma reduïda de GRx (GRx-SH). Aquesta és regenerada al seu torn per GSH que actua com a substrat. La forma oxidada de GSH (GSSG) és de nou regenerada a la reduïda (GSH) a través de la GSH reductasa (modificat de (Gallogly and Mieyal 2007)).

Malgrat l'agent cel·lular reductor GSH esdevingui un potent antioxidant tiòlic, existeixen agents químics reductors també capaços d'inhibir l'oxidació dels grups tiols de les proteïnes tals com el DTT (*dithiothreitol*) i NAC (*N-Acetylcysteine*). DTT com agent reductor permeable a la cèl·lula conté dos grups tiols que li permeten realitzar reaccions de bescanvi dels ponts disulfur (Figura I22). L'antioxidant té la capacitat d'estabilitzar les proteïnes amb grups tiols i, al seu torn, afavorir l'acció antioxidant de biomolècules amb també grups tiols com és el cas del GSH. Per altra banda, el DTT també és capaç d'interaccionar i reaccionar de forma directa amb el radical hidroxil i el peròxid d'hidrogen (Hualel 2003).



**Figura I22. Mecanisme antioxidant del DTT en el manteniment dels grups tiols de les proteïnes.** A) L'oxidació de dos grups tiols propers (RSH) dona lloc a la formació de ponts disulfur (RSSR). B) L'agent reductor DTT (DTT red) és capaç de reduir aquest enllaç per dues reaccions de reducció seqüencials que permet restablir els dos grups tiols de la proteïna al seu estat inicial (RSH) (modificat de (Hualei 2003)).

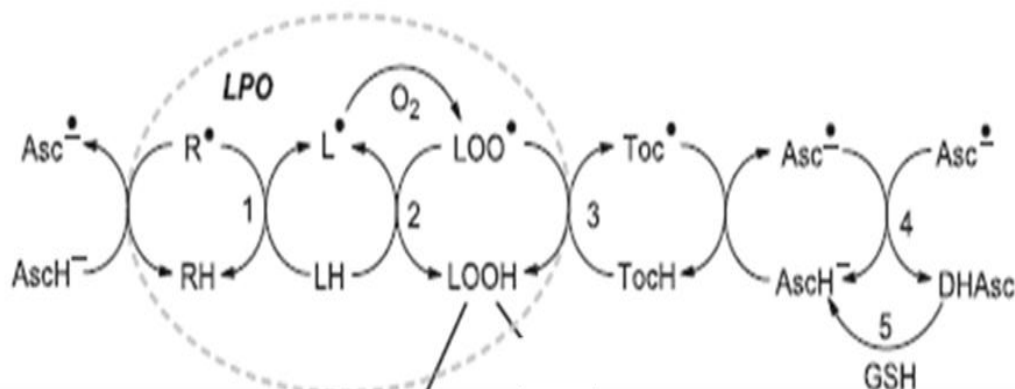
NAC té un caràcter d'actuació antioxidant a diferents nivells (Figura I23). Per una banda, té un efecte directe en el radical hidroxil i el peròxid d'hidrogen en la seva reducció a aigua i d'altra banda, contribueix en el manteniment dels grups tiols de les proteïnes actuant com a precursor de síntesi de la molècula GSH (Cotgreave and Moldeus 1987; Moldeus, Cotgreave et al. 1986; Ueno, Yamada et al. 2011).



**Figura I23. Actuació antioxidant de NAC.** NAC pot inhibir l'efecte de dany oxidatiu de ROS per interacció directa amb peròxid d'hidrogen i el radical hidroxil o estimulant la síntesi de GSH afavorint així, l'acció detoxificadora de l'agent reductor (modificat de (Sadowska 2012)).

Existeixen també formes químiques de les molècules antioxidants de la vitamina C i la vitamina E. Aquests compostos químics realitzen la funció antioxidant d'aquestes vitamines, la qual consisteix principalment en la prevenció de la peroxidació lipídica (Traber and Stevens 2011). Aquest efecte es deu a la capacitat que tenen aquests antioxidants d'interceptar els radicals lipídics intermediaris produïts durant el fenomen de peroxidació lipídica (Figura I24). Entre les diferents formes químiques de les vitamines C i E destaquen: l'àcid ascòrbic (AA) com a forma química de la vitamina C,  $\alpha$ -tocopherol (TCP) com a forma química de la vitamina E, i Trolox (TRO) com a anàleg d'aquesta última. L'activitat antioxidant de la vitamina C, a més, es basa en la interacció

directa de les espècies reactives de l'oxigen i en la regeneració de la forma reduïda de la vitamina E (Novo and Parola 2008).



**Figura I24. Mecanismes antioxidants de la vitamina C i E durant el fenomen de peroxidació lipídica (LPO).** La cadena en reacció LPO (passos 1 i 2) és iniciada per espècies de radicals lliures ( $R^\bullet$ ) que converteixen la forma lipídica reduïda (LH) en la forma oxidada ( $LOO^\bullet$ ) que ataca un altre LH per generar de nou radical lipídic ( $L^\bullet$ ). La propagació de la reacció LPO pot ser finalitzada amb la vitamina E o derivats (pas 3 amb  $\alpha$ -Tocopherol (TocH) com a derivat). El radical tocopherol ( $Toc^\bullet$ ) és regenerat de nou a la seva forma reduïda (TocH) per la vitamina C o derivats (aquí és mostrat l'àcid ascòrbic (AscH)). La reducció de  $Toc^\bullet$  per AscH implica la generació del radical lliure de l'àcid (Asc•). Asc• és de nou també regenerat a la seva forma reduïda (AscH) a través de la reducció de la molècula dehydroascrobat (DHAsc) (pas 4) utilitzant l'enzim DHAsc reductasa depenent de GSH (aquí indicat com a GSH en pas 5). AscH addicionalment a la regeneració de TocH, també pot interaccionar amb les espècies de radicals lliures del principi  $R^\bullet$  abans que es desencadeni el fenomen LPO (modificat de (Traber and Stevens 2011)).

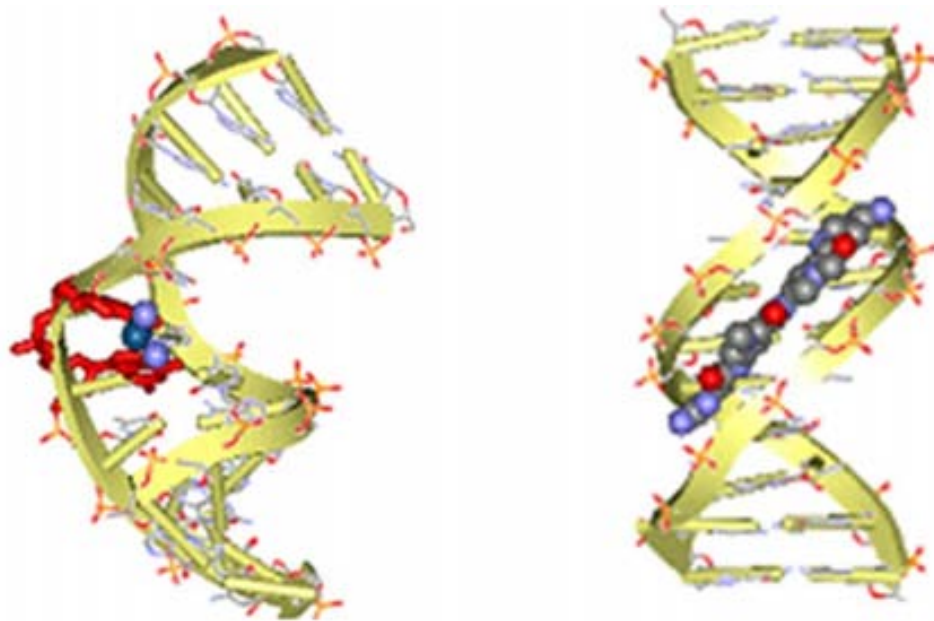
### 2.3.2.B.2. Dany genotòxic per agents intercalants

Els compostos genotòxics es caracteritzen per induir un dany a l'ADN que, en cas de ser irreparable, acaba activant la via intrínseca o mitocondrial. En el cas dels agents intercalants, l'afectació a l'ADN es realitza de forma directa per intercalació de les bases nitrogenades. La capacitat d'inserció d'aquests agents a les bases nitrogenades de l'ADN s'associa a la presència d'un cromòfor heterocíclic aromàtic en l'estructura d'aquests compostos. Durant la interacció de l'ADN, l'intercalant s'introdueix entre dos parells de bases nitrogenades consecutives de la doble hèlix (Berman and Young 1981). La formació del complex usualment és reversible i implica varis tipus d'interaccions no covalents en la inserció perpendicular del compost. Destaquen forces interactives com els ponts d'hidrogen, interaccions hidrofòbiques, electrostàtiques i forces de tipus van der Waal's com a més predominants. La presència d'enllaços covalents en la interacció de l'ADN només es mostra en intercalants com el cisplatí i els seus derivats, on la unió a l'ADN és llavors irreversible (Martinez and Chacon-Garcia 2005) (Figura I25).

Cal dir, que la interacció dels intercalants a l'ADN induïx canvis estructurals a nivell de desenrotllament, llargada i rigidesa de la doble hèlix que poden implicar a les utorn canvis funcionals. La constitució del complex intercalant-ADN implica també la presència de la topoisomerasa II i la seva desestabilització es relaciona amb una major activitat genotòxica del compost. No obstant, el dany genotòxic es desencadena principalment per la citotoxicitat derivada en la inhibició de l'acció de la topoisomerasa II (Baguley 1991). Malgrat la citotoxicitat produïda en conjunt per aquest complex ternari, es poden donar mecanismes de resistència a aquesta citotoxicitat associats a: la naturalesa intrínseca del compost per una ineficient absorció o activació del fàrmac o bé, a la capacitat de la cèl·lula en reparar el dany induït pel fàrmac per un increment d'expressió d'enzims reparadors de l'ADN (Stordal and Davey 2007).

Entre els diferents tipus d'agents d'unió a l'ADN, cal dir que, a part dels esmentats agents intercalants, existeixen compostos que interaccionen amb l'ADN a través de la seva unió específica al solc menor, o de forma menys freqüent, al solc major de l'ADN (Lerman 1961; Martinez and Chacon-Garcia 2005) (Figura I25). A més a més, hi han diferents treballs que tracten d'associar aquests efectes específics d'unió a l'ADN amb la condensació i la fragmentació de la cromatina. Tot i així, els pocs casos reportats en l'anàlisi d'aquest camp, relacionen una absència de la condensació de la cromatina amb agents d'unió al solc menor. Pel que fa a la fragmentació oligonucleosomal, aquesta s'ha relacionat amb agents que presenten propietats intercalants a l'ADN (Widlak, Palyvoda et al. 2002).

Cal esmentar, que una gran varietat de famílies de compostos presenten propietats intercalants i que aquests s'utilitzen pel disseny de gran quantitat d'anàlegs farmacològics. Entre aquestes famílies s'inclouen les acridines, els alcaloides, les antraciclinaes, les antracenediones, els arilaminoalcohols, les cumarines, els indols, les fenantridines, les quinolines i les quinoxalines. Varies d'aquestes famílies, com ara la dels indols, les quinolines i les acridines, inclouen compostos intercalants com a també potents inhibidors de la topoisomerasa I (Twelves, Gardner et al. 1999; Ohyama, Li et al. 1999). A més a més, s'ha vist que la doble inhibició de les topoisomerases I i II es correlaciona amb una major activitat antitumoral dels compostos (Riou, Fosse et al. 1993). Cal afegir, que s'han arribat a dissenyar compostos doblement intercalants a partir de la inserció de dos cromòfors a les bases nitrogenades, sent anomenats com a bis-intercalants. Aquests derivats tenen una major afinitat d'unió a l'ADN i es poden utilitzar a menors concentracions reduint, així, la incidència dels efectes secundaris (Martinez and Chacon-Garcia 2005).



**Figura I25. Exemples estructurals d'intercalació a l'ADN.** A l'esquerre, estructura d'ADN unida covalentment a cisplatí. A la dreta, ADN acomplexat amb l'intercalant netropsina per unió al solc menor de la doble hèlix (modificat de (Yang, van Boom et al. 1995; Taberner, Verdaguer et al. 1993)).

### 2.3.2.B.3. Altres induccions de mort per via mitocondrial: l'estaurosporina com a estímul intrínsec

Gran quantitat d'inductors d'apoptosi poden actuar a diferents nivells de la via intrínseca segons la seva diana cel·lular. L'estaurosporina és un dels estímuls intrínsecs més utilitzats com a inductor de la mort apoptòtica. Aquest component químic de tipus alcaloide, es va aïllar originalment al 1977 com a producte natural a partir de la bactèria *Streptomyces staurosporeus* (Omura, Iwai et al. 1977). Estaurosporina és un inhibidor d'ampli espectre de les quinases i la seva acció inhibidora es basa en impedir la unió de la molècula ATP a la proteïna quinasa. L'efecte inhibitori es deu a l'alta afinitat d'estaurosporina per unir-se al lloc d'unió d'ATP de la quinasa. D'aquesta manera, estaurosporina esdevé un potent inhibidor de quinases caracteritzant-se, però, per una manca de selectivitat cel·lular (Karaman, Herrgard et al. 2008). En conseqüència, la toxicitat cel·lular d'estaurosporina portà a l'exclusió del seu ús en clínica. No obstant, aquest compost ha esdevingut fins aleshores una valuosa eina en recerca bàsica com a inductor d'apoptosi.

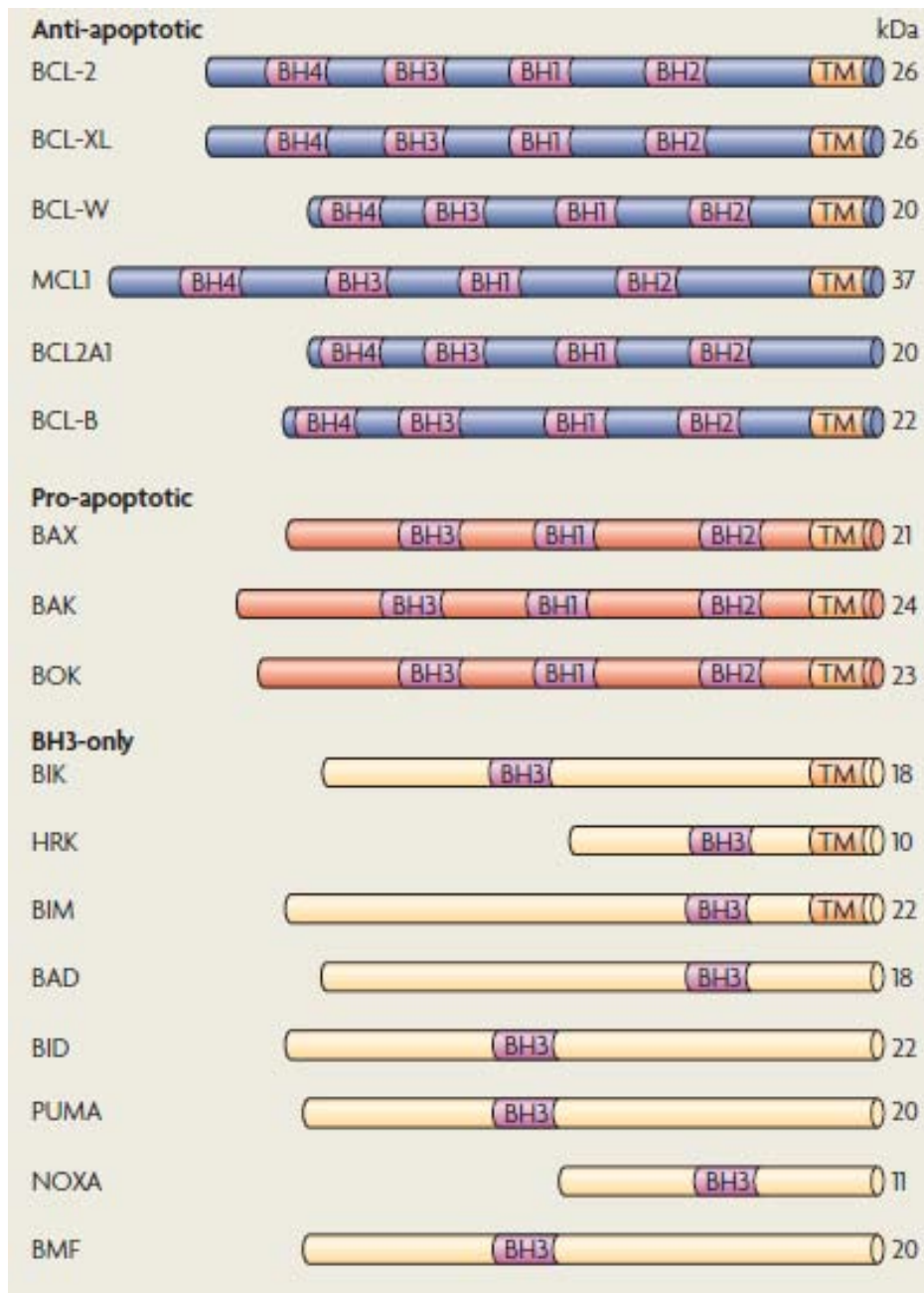
Estaurosporina s'ha emprat com a inductor apoptòtic en una gran varietat de cèl·lules que inclouen des de línees cel·lulars tumorals, a tipus cel·lulars com limfòcits i neurones (Bertrand, Solary et al. 1994; Suzuki, Azuma et al. 1995; Koh, Wie et al. 1995). Malgrat el gran ús d'estaurosporina en el camp apoptòtic, no s'ha aconseguit esbrinar el seu mecanisme d'acció específic. La seva implicació en l'activació de la via mitocondrial es reflexa, però, en diferents àmbits. La mort apoptòtica induïda per aquest alcaloide s'evita en varis models per la sobreexpressió de proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> (Jacobson, Burne et al. 1993; Yuste, Bayascas et al. 2001). Per altra banda, també s'ha descrit que la mort apoptòtica d'aquest estímul implica l'alliberament de citocrom c i l'activació de caspases (Kluck, Bossy-Wetzel et al. 1997; Yang, Liu et al. 1997). Tot i així, estaurosporina no solament es descriu com a inductor apoptòtic, sinó que també s'associa amb processos de diferenciació cel·lular trobats en línees de neuroblastoma i cèl·lules neuronals de rata (Boix, Llecha et al. 1997; Frassetto, Schlieve et al. 2006). A més, s'ha identificat una part de la seva estructura com a una regió determinant en la inducció de la diferenciació en precursors neuronals, suggerint estaurosporina com a un possible prototipus de fàrmac per malalties neurodegeneratives (Thompson and Levin 2010).

### 2.3.2.C. Proteïnes de la família BCL-2 i regulació de la permeabilització mitocondrial

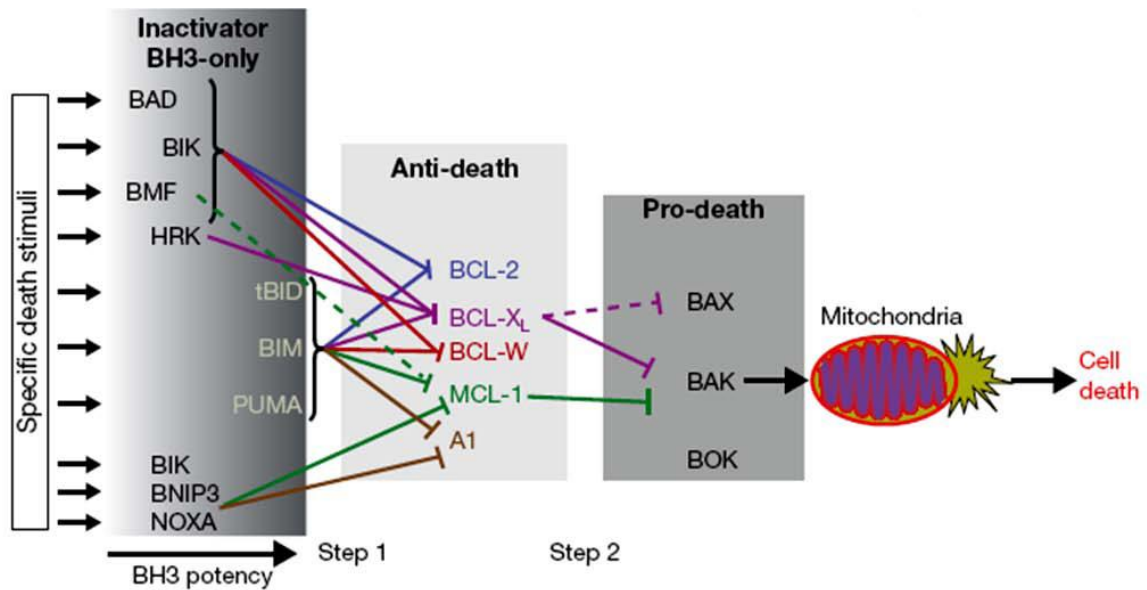
Les proteïnes de la família Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) tenen un paper clau en la regulació de la permeabilització de la membrana externa mitocondrial i en la conseqüent activació de la via intrínseca. Els membres d'aquesta família es classifiquen funcionalment en proteïnes apoptòtiques i antiapoptòtiques. La regulació de les interaccions entre aquestes proteïnes determina el balanç final de dirigir la cèl·lula cap a una senyal de supervivència, o desencadenar una resposta apoptòtica en la via mitocondrial. La família Bcl-2 inclou 3 subgrups de proteïnes agrupats segons la presència d'unes seqüències, altament conservades i homòlogues a regions de la proteïna Bcl-2, anomenades com a dominis BH (*Bcl-2 homology*) (Figura I26).

Un dels subgrups pertany a la subfamília de proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 caracteritzats per la presència dels quatre dominis conservats BH (BH1, BH2, BH3 i BH4) i del domini transmembranaral TM a excepció de l'antiapoptòtica Bcl2A1 defectiva en aquest últim. El domini TM situat a l'extrem C-terminal permet localitzar aquestes proteïnes a la membrana externa mitocondrial, tot i que també poden ubicar-se al citosol, a la membrana reticular i a l'envolta nuclear (Zamzami, Brenner et al. 1998). La subfamília antiapoptòtica inclou un ampli ventall de

proteïnes tals com Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> (*BCL-2-related gene, long isoform*), Bcl-w, Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*), Bcl2A1/A1/Bfl-1 (*BCL-2-related gene A1*) i Bcl-B/Bcl2L10/Boo/Diva. Totes elles tenen com a funció principal preservar la integritat de la membrana externa mitocondrial per tal d'evitar la sortida dels factors mitocondrials pro-apoptogènics i la conseqüent activació de la via intrínseca. L'efecte de protecció d'aquestes proteïnes es realitza per la inhibició directa que duen a terme en les proteïnes pro-apoptòtiques de la família Bcl-2 (revisat en (Taylor, Cullen et al. 2008)).

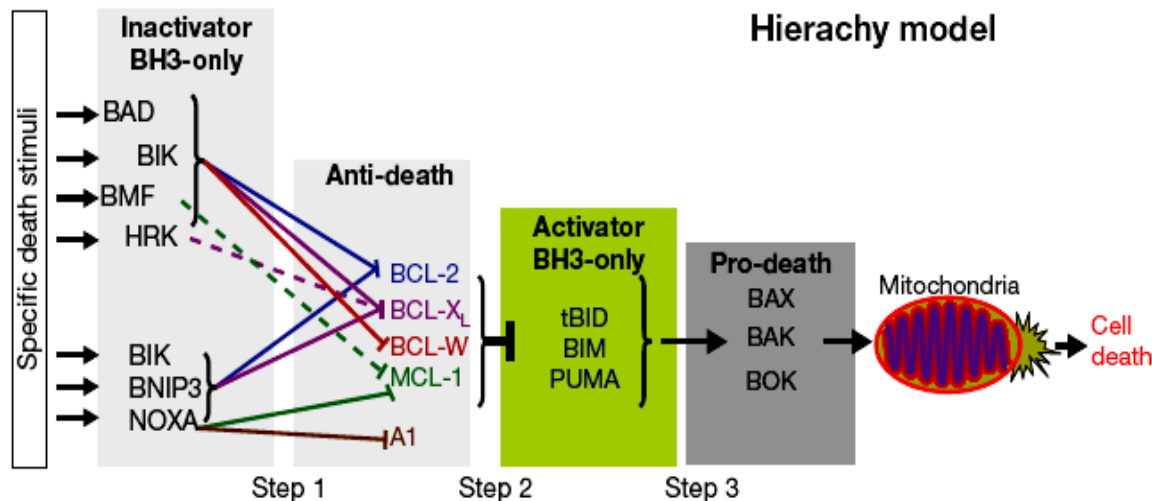


**Figura I26. Família de proteïnes Bcl-2.** S'indiquen els diferents dominis BH (*Bcl-2 homology*) i transmembranals (TM) juntament amb el pes molecular (a la dreta) per cada una de les proteïnes dels diferents subgrups. A dalt, el subgrup de les proteïnes antiapoptòtiques seguit per la subfamília proapoptòtica de Bax i de les proteïnes *BH3-only* (font: (Taylor, Cullen et al. 2008)).



**Figura I27. Model directe d'acció de les proteïnes BH3-only.** Pas 1: les proteïnes BH3-only són activades en resposta a un estímul de mort per unir-se i inactivar els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2. Pas 2: L'activació de les proteïnes BH3-only evita l'associació entre els membres antiapoptòtics i els apoptòtics de la subfamília Bax pel que aquests deixen d'estar inhibits i executen la seva funció apoptòtica mitocondrial (font: (Galonek and Hardwick 2006)).

Els altres dos subgrups tenen una activitat pro-apoptòtica i engloben el subgrup de la família Bax i el de les anomenades proteïnes BH3-only. La subfamília de Bax inclou les proteïnes pro-apoptòtiques Bax, Bak i Bok/MTD caracteritzades per la presència de tres dominis BH (BH1, BH2 i BH3) i el domini transmembranaral TM (Suzuki, Youle et al. 2000). La seva acció pro-apoptòtica s'exerceix a través de la formació d'uns porus en la membrana mitocondrial externa a partir de la homo-oligomerització de Bax i Bak, que porten a la desestabilització membranaral i al consegüent alliberament de factors mitocondrials pro-apoptogènics (Letai, Bassik et al. 2002). Pel que fa a la subfamília apoptòtica de les proteïnes BH3-only, aquestes únicament presenten el domini BH3 com a regió determinant per l'execució de la funció apoptòtica i en alguns casos, el domini transmembranaral TM (Wang, Yin et al. 1996). Aquest subgrup inclou les següents proteïnes: Bik, Hrk/DP5, Bim/Bod, Bad, Bid, Puma/BBC3, Noxa i BMF. Dintre del mateix subgrup BH3-only, aquestes proteïnes poden exercir la seva funció apoptòtica interaccionant amb el primer subgrup esmentat de proteïnes antiapoptòtiques o amb el segon de proteïnes pro-apoptòtiques. Els mecanismes d'acció d'aquestes proteïnes es basa en la postulació de dues teories: el model directe o neutre, i el model jeràrquic (Figures I27 i I28). Tots dos models acaben implicant igualment l'activació de Bax i Bak per la desestabilització de la membrana externa mitocondrial i la seva consegüent permeabilització.



**Figura I28. Model jeràrquic d'actuació de les proteïnes BH3-only.** Pas 1: proteïnes BH3-only específiques s'uneixen i inactiven els membres antiapoptòtics en resposta a un estímul de mort actuant com a "facilitadors" o "sensibilitzadors". Pas 2: la inactivació de les proteïnes antiapoptòtiques permet l'alliberament de determinades BH3-only que actuen com a "activadors". Pas 3: les BH3-only activadores executen la seva funció d'activació en els membres apoptòtics de la subfamília de Bax (font: (Galonek and Hardwick 2006)).

### 2.3.2.D. Alliberament de factors mitocondrials pro-apoptogènics

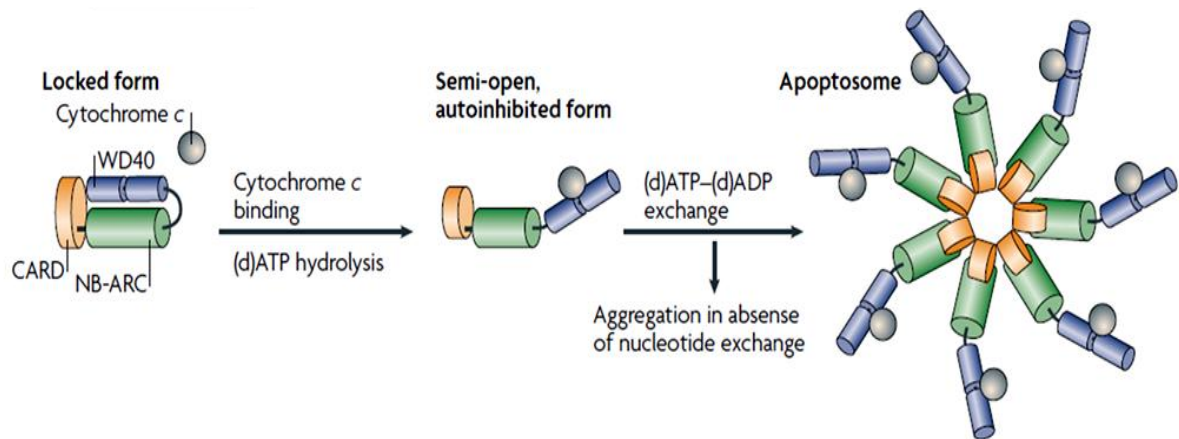
Diversos factors mitocondrials pro-apoptogènics s'alliberen al citosol degut a la permeabilització de la membrana externa mitocondrial, ja sigui per induir una resposta apoptòtica depenent o independent de caspases (Figura I30). Tal i com ja s'ha esmentat en punts anteriors, aquests factors són: citocrom C, SMAC/DIABLO, AIF, l'endonucleasa G (Endo G) i el factor HtrA2/Omi.

Citocrom c és clau en la constitució de l'anomenat complex proteic apoptosoma i en la posterior activació de la caspasa iniciadora caspasa-9. La plataforma proteica requereix de diferents components cel·lulars a part de citocrom C: la molècula adaptadora APAF-1 (*apoptosi protease-activating factor-1*), la molècula d'ATP i la pro-caspasa iniciadora pro-caspasa 9. El complex es constitueix per set molècules d'APAF-1 que permetran formar una estructura circular favorable pel reclutament i posterior activació de la pro-caspasa 9 (Figura I29).

SMAC/DIABLO i Htr2A/Omi també tenen una implicació mitocondrial pro-apoptogènica rellevant en el desencadenament de l'apoptosi depenent de caspases. La funció pro-apoptòtica d'aquesta molècules rau en la neutralització específica dels inhibidors endògens de les caspases IAPs. Els dos factors mitocondrials contenen una seqüència N-terminal conservada de 4 residus (AVPI en el cas de SMAC i AVPS per Omi) que constitueix el motiu d'unió a la IAP definit com a IBM (*IAP binding motif*) (Mastrangelo, Cossu et al. 2008; Hegde, Srinivasula et al. 2002). De forma concreta, la forma inactiva de SMAC resideix a l'espai intermembranar mitocondrial com a homodímer amb dos motius IBM amb capacitat d'interacció amb els dominis BIR2 i BIR3 de les IAPs (Huang, Rich et al. 2003). SMAC pot unir-se a diferents tipus d'IAPs tot i que la seva principal diana és XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) (Vaux and Silke 2003; Hunter, Kottachchi et al. 2003). Pel que fa a Omi, la seva forma madura es processa en l'espai intermembranar i tan sols presenta un domini IBM a l'extrem N-terminal (Suzuki, Imai et al. 2001). En el cas d'Omi, però, la neutralització dels inhibidors endògens de les caspases no solament s'executa a nivell d'interacció. La seva inhibició també es descriu per processament catalític o

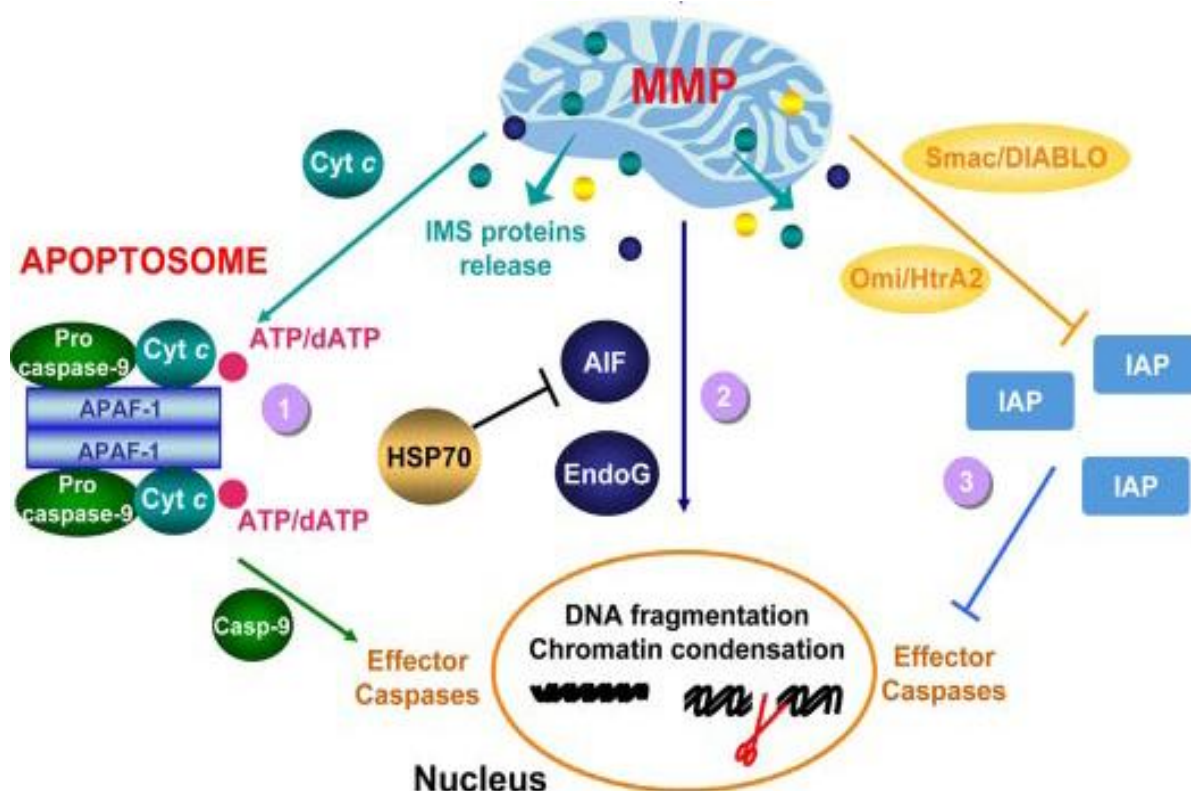


degradació de les IAPs (Yang, Church-Hajduk et al. 2003; Srinivasula, Gupta et al. 2003). No obstant, el factor mitocondrial pro-apoptogènic HtraA2/Omi també s'associa a processos de mort independents de caspases basats en la seva activitat proteolítica de serina proteasa (Garrido and Kroemer 2004). En concret, s'han identificat múltiples substrats de la proteasa amb certa preferència pel processament de proteïnes del citoesquelet (Vande Walle, Van Damme et al. 2007).



**Figura I29. Mecanisme de formació de l'apoptosoma.** La molècula adaptadora APAF-1 és constituïda per tres regions funcionals: el domini CARD que li permet la interacció amb la pro-caspasa 9, el domini NB-ARC amb activitat ATPasa, i el motiu estructural WD40 a través del qual APAF-1 s'uneix a citocrom c. En condicions d'estímul apoptòtic, després de la unió de citocrom c a APAF-1, dATP és hidrolitzat a dADP i posteriorment aquest és bescanviat de nou pel domini ATPasa. Aquest procés genera una sèrie de canvis conformacionals que permet la constitució d'un heptàmer proteic circular i el conseqüent reclutament i activació de la pro-caspasa 9 (Font: (Riedl and Salvesen 2007)).

AIF i Endo G, en canvi, després de d'alliberar-se al citosol migren al nucli per induir la fragmentació de l'ADN de forma independent de caspases (Figura I30). AIF és present en l'espai intermembranar de la mitocondria en forma de monòmer soluble o unit a la membrana interna. En condicions d'apoptosi, l'alliberament d'AIF al citosol requereix un previ processament proteolític per alliberar-se del seu ancoratge a la membrana interna mitocondrial. Aquest processament es pot regular a través de varis tipus de proteases com calpaïnes i cathepsines, així com també s'hi pot trobar implicat l'enzim nuclear PARP1 (Koh, Dawson et al. 2005). D'altra banda, la migració al nucli d'aquest factor s'associa a la inducció d'una condensació parcial de la cromatina i a una fragmentació de l'ADN en fragments d'alt pes molecular, per un procés que implica directament la seva unió a l'ADN (Vahsen, Cande et al. 2006). Pel que fa a Endo G, en canvi, aquesta després de la seva migració al nucli és capaç de desencadenar una fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (Li, Luo et al. 2001). S'ha suggerit un mecanisme independent de caspases en l'alliberament d'Endo G regulat per la proteïna pro-apoptòtica tBid (van Loo, Schotte et al. 2001).



**Figura 130. Alliberament dels diferents factors mitocondrials pro-apoptogènics.** Després del fenomen de permeabilització de la membrana mitocondrial (MMP), diverses proteïnes pro-apoptogèniques s'alliberen des de l'espai intermembranal mitocondrial (IMS) al citosol per activar la via mitocondrial ja sigui de forma dependent de caspases (1 i 3) o independent de caspases (2). 1) Citocrom c promou la constitució de la plataforma proteica apoptosoma juntament amb Apaf-1, pro-caspasa-9 i ATP/dATP. El complex proteic permet activar la caspasa iniciadora que, al seu torn, activarà les caspases efectores per la inducció de les principals característiques apoptòtiques morfològiques i bioquímiques: la fragmentació de l'ADN i la condensació de la cromatina. 2) AIF i EndoG s'alliberen al citosol i es transloquen al nucli per induir una fragmentació de l'ADN. Hsp70 pot inhibir la translocació nuclear d'AIF. 3) Omi i SMAC/DIABLO promouen l'apoptosi per inhibició de les IAPs afavorint l'activació de les caspases efectores (adaptat de (Kroemer, Galluzzi et al. 2007)).

### 2.3.2.E. Estratègies terapèutiques en la via intrínseca: BH3 mimètics

Actualment, la inhibició de la funció antiapoptòtica de les proteïnes de la família Bcl-2 és una de les estratègies terapèutiques més rellevants per la inducció de l'apoptosi a través de la via intrínseca. Aquest fet es deu a què moltes cèl·lules cancerígenes adquireixen resistència quimioteràpica perquè incrementen els nivells d'expressió dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 (Frenzel, Grespi et al. 2009). En aquest sentit, s'han dissenyat uns compostos anomenats BH3 mimètics que inhibeixen aquestes proteïnes antiapoptòtiques per la seva unió al solc hidrofòbic d'aquests membres. El disseny d'aquestes molècules s'ha basat en la modificació de pèptids BH3 o bé, en la síntesi de petites molècules orgàniques que mimetitzen el pèptid BH3 (Walensky, Kung et al. 2004; Degterev, Lugovskoy et al. 2001). La recerca actual, però, es basa en aquestes molècules i destaquen múltiples compostos com ABT-737, obatoclox (GX15-070), gossipol, apogossipol, EM20-25 i queleritrina (Oltersdorf, Elmore et al. 2005; Nguyen, Marcellus et al. 2007; Kitada, Leone et al. 2003; Becattini, Kitada et al. 2004; Milanese, Costantini et al. 2006; Chan, Lee et al. 2003).

ABT-737, però, sembla ser el BH3 mimètic més prometedor, donat que indueix citotoxicitat cel·lular de forma individual i sinèrgica en un ampli rang de línees cel·lulars i pot causar la completa regressió de tumors en models de ratolí (Oltersdorf, Elmore et al. 2005). De fet, aquest

BH3 mimètic es comporta de forma similar a la proteïna pro-apoptòtica Bad. ABT-737 té una alta afinitat per interaccionar amb els membres antiapoptòtics Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>, tot i que també s'ha relacionat amb la inhibició de Bcl-w (Oltersdorf, Elmore et al. 2005; Zhai, Jin et al. 2006; Bruncko, Oost et al. 2007). De fet, s'ha vist que ABT-737 sensibilitza a mort cel·lular línees cel·lulars tumorals amb alts nivells de Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> (Tahir, Yang et al. 2007). De forma oposada, s'ha reportat la resistència a aquest BH3 mimètic en línees cel·lulars amb alts nivells de Mcl-1 donat que ABT-737 no interacciona amb aquest membre antiapoptòtic (van Delft, Wei et al. 2006). Obatoclast, en canvi, pot unir-se tant a Mcl-1 com Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Bcl-w tot i que amb una afinitat més baixa que els altres BH3 mimètics (Nguyen, Marcellus et al. 2007; Wang, Nikolovska-Coleska et al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006). Per altra banda, s'ha descrit que ABT-737 induïx apoptosi provocant un trencament de la membrana externa mitocondrial i induïnt l'activació de caspasa-9 (Vogler, Weber et al. 2009).

Pel que fa als BH3 mimètics com gossipol i el seu derivat apogossipol, aquests induïxen apoptosi per la seva interacció amb els antiapoptòtics Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Mcl-1 (Kitada, Leone et al. 2003; Wang, Nikolovska-Coleska et al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006; Becattini, Kitada et al. 2004). Referent a EM20-25 i queleritrina, aquests BH3 tan sols inhibeixen un membre antiapoptòtic. EM20-25 és capaç de sensibilitzar a mort cel·lulars tumorals sobreexpressores de Bcl-2 per la seva interacció amb la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 (Milanesi, Costantini et al. 2006). I finalment, queleritrina també s'inclou en aquest tipus d'agents terapèutics per la inhibició de la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub> (Chan, Lee et al. 2003).

### 2.3.2.E.1. Queleritrina

Queleritrina es va identificar com a BH3 mimètic entre un *screening* de múltiples productes naturals. Aquest alcaloide pertany a la família de les benzofenantridines i prové de la planta *Chelidonium majus* del gènere *Papaveraceae* (Chan, Lee et al. 2003) (Figura I31). Queleritrina es descriu amb un ampli rang d'activitats biològiques que inclouen des de propietats anticoagulants i antiinflamatòries, a l'antitumoral com a la més potent (Ko, Chen et al. 1990); (Lenfeld, Kroutil et al. 1981). S'ha observat que aquest compost provoca toxicitat cel·lular en diverses línees cel·lulars tumorals i, a més a més, s'ha vist que és capaç d'endarrerir el creixement tumoral *in vivo* (Chang, Chang et al. 2003); (Chmura, Dolan et al. 2000). Inclús, s'ha descrit un efecte sinèrgic d'inducció de mort cel·lular amb altres agents antitumorals (Cabrespine, Bay et al. 2005). Queleritrina ha arribat, a més, a fase pre-clínica com agent terapèutic BH3 mimètic (Taylor, Micha et al. 2006); (Fischer and Schulze-Osthoff 2005).

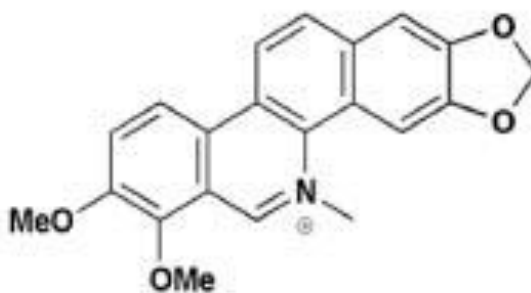


Figura I31. Estructura química de la queleritrina. (Modificat de (Chan, Lee et al. 2003)).

Malgrat però la seva actual consideració com a BH3 mimètic, queleritrina inicialment es va descriure com a inhibidor de la proteïna quinasa PKC (Herbert, Augereau et al. 1990). Tot i així, més tard s'observà que la inducció d'apoptosi per queleritrina no requeria la inhibició de PKC (Yu, Mandlekar et al. 2000). En concret, s'han descrit mecanismes de mort apoptòtica independents de PKC associats a processos d'estrès oxidatiu i a l'activació de les quinases JNK i p38 (Yu, Mandlekar et al. 2000).

Per altra banda, s'ha descrit que queleritrina indueix toxicitat cel·lular en cèl·lules sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub> resistents a altres estímuls apoptòtics (Chan, Lee et al. 2003). S'ha reportat també, que aquest alcaloide indueix l'alliberament de citocrom c, inclús, en mitocondries aïllades. A més, s'ha detectat que queleritrina indueix apoptosi de forma independent a les proteïnes pro-apoptòtiques Bax i Bak, ja que aquest alcaloide provoca mort cel·lular en els dobles *knock-out* (DKO) de Bax i Bak i sense alterar el fenotip apoptòtic de mort induït (Chan, Lee et al. 2003; Wan, Chan et al. 2008). En aquests mecanismes de mort independents de Bax i Bak s'ha observat, a més, un inflament de la mitocondria i una pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial (Wan, Chan et al. 2008). De fet, un altre efecte important mitocondrial induït per queleritrina és la seva capacitat de desacoblar la cadena respiratòria mitocondrial, tant en cèl·lules com en mitocondries aïllades (Milanesi, Costantini et al. 2006).

Una altra propietat descrita per aquest alcaloide, és la seva habilitat per unir-se a l'ADN. Queleritrina juntament amb altres compostos de la seva família de benzofenantridines, es descriu com a un compost amb propietats intercalants (Bajaj, McLean et al. 1990). La capacitat d'unió a l'ADN d'aquests compostos s'associa amb la presència de purines i pirimidines alternades (Bajaj, McLean et al. 1990; Bai, Zhao et al. 2006). En concret, s'ha vist una preferència d'unió en seqüències de l'ADN riques en GC contigües per queleritrina i alternades, per altres compostos de la mateixa família com és el cas de la sanguinarina (Bai, Zhao et al. 2006). Per altra banda, un anàlisi de diferents compostos de la família de les benzofenantridines suggereix una correlació entre les propietats intercalants dels alcaloides i el seu dany en la cadena respiratòria mitocondrial (Kamins'kyi, Kryv'iak et al. 2006).

### 2.3.3. La necrosi

#### 2.3.3.A. Generalitats

Les cèl·lules que pateixen necrosi manifesten una morfologia cel·lular clarament diferencial de l'apoptòtica. La cèl·lula necròtica adopta una forma arrodonida i es caracteritza per patir una pèrdua temprana del control en la permeabilitat de la membrana plasmàtica que afavoreix al fenomen de l'oncosi. Aquest indueix el trencament de la membrana plasmàtica i a l'alliberament indiscriminat de tot el contingut necròtic a l'espai extracel·lular amb el desencadenament dels conseqüents processos d'inflamació. Pel que fa al nucli, aquest es manté intacte per l'absència de la condensació de la cromatina i de la seva fragmentació i pot agregar-se i acumular-se en els teixits necròtics (revisat en (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). Entre els esdeveniments característics d'un procés de mort necròtica destaquen la depleció dràstica d'ATP, la producció de ROS i la secreció al medi extracel·lular del mediador inflamatori HMGB-1 (*high-mobility group box-1*) (Eguchi, Shimizu et al. 1997; Vercammen, Brouckaert et al. 1998; Rovere-Querini, Capobianco et al. 2004).

Per altra banda, tal i com s'ha vist en les diferents definicions dels processos de mort cel·lular, cal remarcar que en els últims anys s'ha consolidat el terme de necrosi regulada com a contraposat al d'un procés de mort necròtic descontrolat i caòtic (veure apartat 2.3.1. "Tipus de mort acceptats per la NCCD"). Diversos estímuls poden desencadenar una necrosi regulada com ara: el dany genotòxic, l'acció d'excitotoxines, la lligació de receptors de mort o fins i tot, l'acció immunològica dels membres de la família PRR (*pathogen recognition receptor*) en el reconeixement dels patrons moleculars associats a patògens (Zong, Ditsworth et al. 2004; Bano, Young et al. 2005; Zhang, Shao et al. 2009; Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). En qualsevol cas, el procés de necrosi regulada més estudiat en els darrers anys és el de necroptosi. Per aquesta raó, a continuació es detallen els principals mecanismes de senyalització associats a aquest cas específic de necrosi regulada.

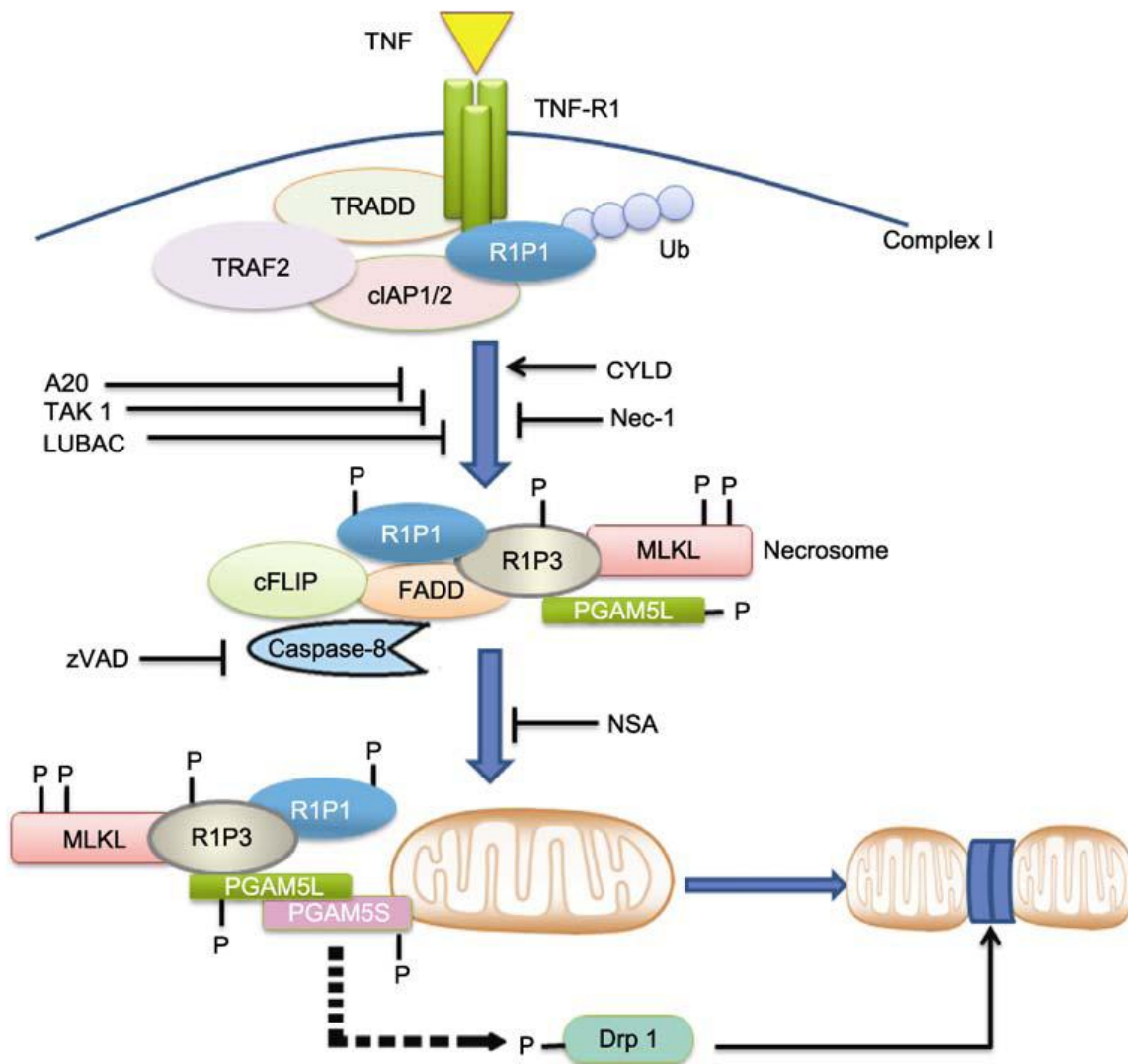
### 2.3.3.B. Necroptosi

Necroptosi és el tipus de necrosi regulada més reportat darrerament a nivell de recerca de molècules implicades en les vies de senyalització d'aquesta modalitat de mort necròtica. Inclou els casos de necrosi regulada dependents de les quinases RIP1 i/o RIP3. El descobriment de l'inhibidor químic necrostatina-1 en la quinasa RIP1, ha identificat en els darrers anys gran quantitat de processos de mort necroptòtics (Degterev, Huang et al. 2005; Degterev, Hitomi et al. 2008). No obstant, els casos de necroptosi dependents de RIP3 i independents de RIP1 no es poden evitar per l'inhibidor químic, i són igualment considerats processos de mort necroptòtics (Upton, Kaiser et al. 2010). Inclús, es postula sobre altres possibles dianes de l'inhibidor químic en la mort necroptòtica (Cho, McQuade et al. 2011).

El principal avanç en la cerca de molècules implicades en les vies de senyalització necroptòtica, s'ha analitzat en la lligació del receptor de mort de TNF en absència d'activació de caspases (Vercammen, Beyaert et al. 1998). En particular, el model necroptòtic en el lligand de mort TNF es desencadena amb la inhibició química o el *knockdown* de la caspasa iniciadora caspasa-8 (Holler, Zaru et al. 2000). La senyal necroptòtica s'inicia, llavors, en el moment que el complexe transmembranar del receptor de mort (complexe I) es desubiquitina a nivell de la quinasa RIP1, per acció d'enzims desubiquitinadors tals com CYLD (*cylindromatosis*) o bé, per efecte de la inhibició dels seus ubiquitinadors directes, com són les cIAPs (Hitomi, Christofferson et al. 2008; Varfolomeev, Goncharov et al. 2008). Al seu torn, l'estat desubiquitinat del complexe I no permet reclutar el complexe ubiquitinador LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) capaç d'estimular la via de supervivència NF- $\kappa$ B (Tokunaga, Sakata et al. 2009).

En cas d'insult apoptòtic, es coneix que la desubiquitinació del complexe I permet a RIP1 reclutar la molècula adaptadora FADD i la caspasa 8, per la constitució del complexe citosòlic II i el conseqüent desencadenament de la via apoptòtica (Micheau and Tschopp 2003). No obstant, si RIP3 hi és present i caspasa-8 està inactiva, es promou la formació del complexe citosòlic IIb anomenat necrosoma (Holler, Zaru et al. 2000; Cho, Challa et al. 2009). Per la transducció de la senyal necroptòtica, es requereix que caspasa-8 estigui inactiva, ja que aquesta pot inhibir RIP1 i RIP3 per processament proteolític (Feng, Yang et al. 2007; Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). Recentment, s'ha suggerit que la interacció entre RIP1 i RIP3 precedeix a una autofosforilació de RIP3, que permet reclutar nous components al necrosoma com la quinasa MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*) i la fosfatasa mitocondrial PGAM5 (Sun, Wang et al. 2012; Wang, Jiang et al. 2012). A més, en el laboratori de X. Wang, s'ha trobat un compost químic referit com a necrosulfamida (NSA), capaç d'inhibir la mort necroptòtica a nivell de la quinasa MLKL (Sun,

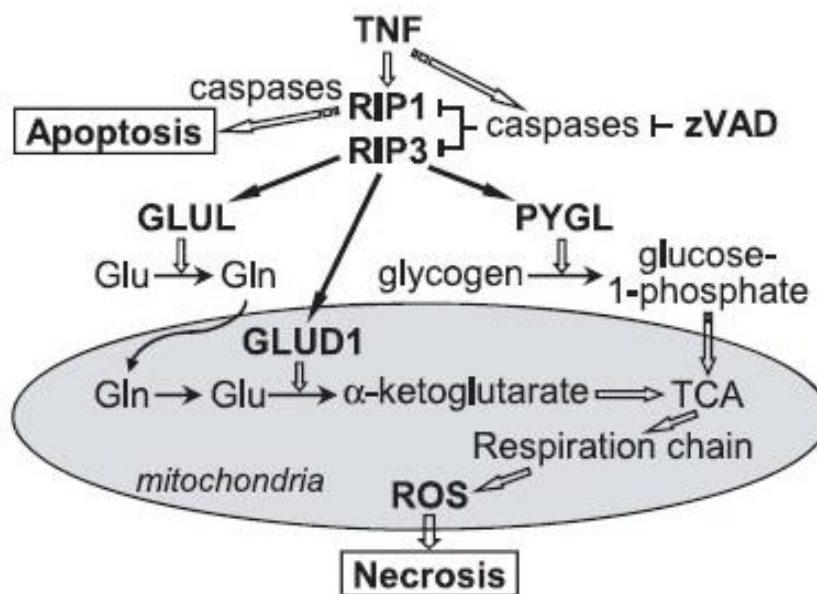
Wang et al. 2012). La quinasa reclutada al necrosoma es troba doblement fosforilada per RIP3, i totes dues fosforilacions es requereixen per l'execució de la mort necroptòtica (Sun, Wang et al. 2012). Pel que fa a la fosfatasa mitocondrial PGAM5, les seves dues isoformes (PGAML (*long form*) i PGAMS (*short form*)), també es recluten al complexe necrosòmic i es fosforilen a través de RIP3 (Wang, Jiang et al. 2012). L'estat actiu fosforilatiu de les dues isoformes en el complexe necrosòmic, permet activar per defosforilació el regulador de fissió mitocondrial Drp1 (*dynamamin-related protein 1*), pel que s'acaba induint la fragmentació necroptòtica de la mitocòndria (Wang, Jiang et al. 2012) (Figura I32).



**Figura I32. Model de necroptosi en el receptor de mort TNF.** La lligació del receptor de mort TNF permet la constitució del complexe I pel reclutament de TRADD, RIP1, TRAF2 i cIAP 1/2. L'estat ubiquitinat del complexe I s'associa a l'activació de la via de supervivència NF-κB a través del complexe LUBAC. La quinasa TAK1 per interacció amb RIP1 poliubiquitinat pot també inhibir la via de mort. A20 com a enzim editor de la ubiquitinació també actua com a regulador positiu pel manteniment de l'estat poliubiquitinat del complexe I. CYLD estimula la desubiquitinació del complexe per la generació del complexe IIb o necrosoma pel desencadenament de la senyal necroptòtica. El necrosoma es constitueix per FADD, caspasa-8 inactivada (en aquest cas per cFLIP o ZVAD), RIP1, RIP3, MLKL i PGAM5. Necrostatina inhibeix el complexe a nivell de RIP1 i NSA per MLKL. L'activació del necrosoma requereix RIP1 i RIP3 actives pel consegüent reclutament i fosforilació de MLKL i PGAM5. La doble fosforilació de MLKL per RIP3 és seguida de la fosforilació de la isoforma PGAM5L. La isoforma PGAM5S és posteriorment també reclutada i fosforilada al complexe necrosòmic. L'estat actiu de les isoformes PGAM5 permet defosforilar Drp1 per la execució de la fissió mitocondrial (adaptat de (Zhou, Han et al. 2012)).

La implicació de totes aquestes molècules de senyalització en la mort necroptòtica, es realça amb la inhibició d'aquesta mort pel *knockdown* tant de RIP1, RIP3 com MLKL. El silenciament gènic, però, de qualsevol de les dues isoformes de PGAM5 o de Drp1, només aconsegueix atenuar la mort necroptòtica de TNF (Wang, Jiang et al. 2012). No obstant i de forma sorprenent, el silenciament gènic d'aquestes proteïnes també aconsegueix atenuar la mort necròtica induïda per estímuls intrínsecs com els ROS i la sobrecàrrega de calci. Els altres executors necroptòtics no poden, en canvi, evitar la mort d'aquest tipus d'estímuls necròtics (Wang, Jiang et al. 2012).

El desencadenament final de la necroptosi per sota de l'activació del complex necrosòmic, s'associa principalment a esdeveniments cel·lulars com la depleció dràstica d'ATP, la sobreproducció de ROS o la sobrecàrrega de calci citosòlica, amb la conseqüent obertura del porus de transició de permeabilitat mitocondrial (Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2008). No obstant, s'han identificat alguns mecanismes en l'execució final de la necroptosi per implicació directa de RIP1 i RIP3. RIP1 es suggereix en un possible mecanisme de senyalització resultant en la inhibició del translocador d'ATP ANT, pel que acaba contribuint a la depleció necròtica d'ATP (Temkin, Huang et al. 2006). Per altra banda, s'ha vist que RIP3 està implicat de forma directa en la sobreproducció de ROS per activació de varis enzims metabòlics, els qual desencadenen un estrès metabòlic mitocondrial i la conseqüent sobreproducció d'intermediaris oxidatius (Zhang, Shao et al. 2009) (Figura I33).



**Figura I33. Execució necroptòtica de RIP3 en la sobreproducció de ROS.** La mort necroptòtica és desencadenada pel lligand de mort TNF amb la inactivació de caspases i presència de RIP3. RIP3 interacciona i activa els enzims metabòlics PYGL (*glycogen phosphorylase*) implicat en la degradació de glicogen per la obtenció de glucosa-1-fosfat, GLUL (*glutamate-ammonia ligase*) per la conversió de l'aminoàcid glutamat (Glu) a glutamina (Gln) i GLUD1 (*glutamate dehydrogenase 1*) per la obtenció del substrate energètic α-cetoglutarat al cicle de Krebs o d'àcids tricarbòxics (TCA). La sobreactivació del cicle es tradueix amb un increment d'activitat en la cadena de transport electrònic mitocondrial i conseqüent efecte de producció de ROS (modificat de (Zhang, Shao et al. 2009)).

La producció de ROS en la mort necroptòtica, però, únicament no està relacionada amb la mitocondria. En concret, s'ha descrit una implicació de RIP1 en el reclutament de la NADPH oxidasa Nox1 a través de la quinasa rivoftalina (RFK), la qual actua de molècula pont entre el

receptor de mort TNFR1 i la subunitat comuna de les NADPH oxidases p22 phox (Kim, Morgan et al. 2007) (Kim, Morgan et al. 2007; Yazdanpanah, Wiegmann et al. 2009). De fet, s'ha suggerit que la producció del superòxid extracel·lular per Nox1, pot contribuir i afavorir la producció de ROS en la cadena respiratòria mitocondrial durant la mort necroptòtica (Morgan, Kim et al. 2008).

L'efecte cel·lular de ROS acaba induint la disfunció mitocondrial amb la conseqüent parada de síntesi d'ATP. La depleció de la molècula energètica, però, també es pot desencadenar en la mort necroptòtica a nivell de dany oxidatiu a l'ADN. L'enzim reparador d'ADN PARP1, en un excés d'activació resulta en un consum desmesurat del cofactor NAD<sup>+</sup> i la conseqüent, disminució d'ATP (Los, Mozoluk et al. 2002). Al seu torn, també s'ha descrit que la sobreactivació de PARP1 en morts necròtiques pot desencadenar l'alliberament d'AIF de la mitocòndria (Yu, Wang et al. 2002; Moubarak, Yuste et al. 2007).

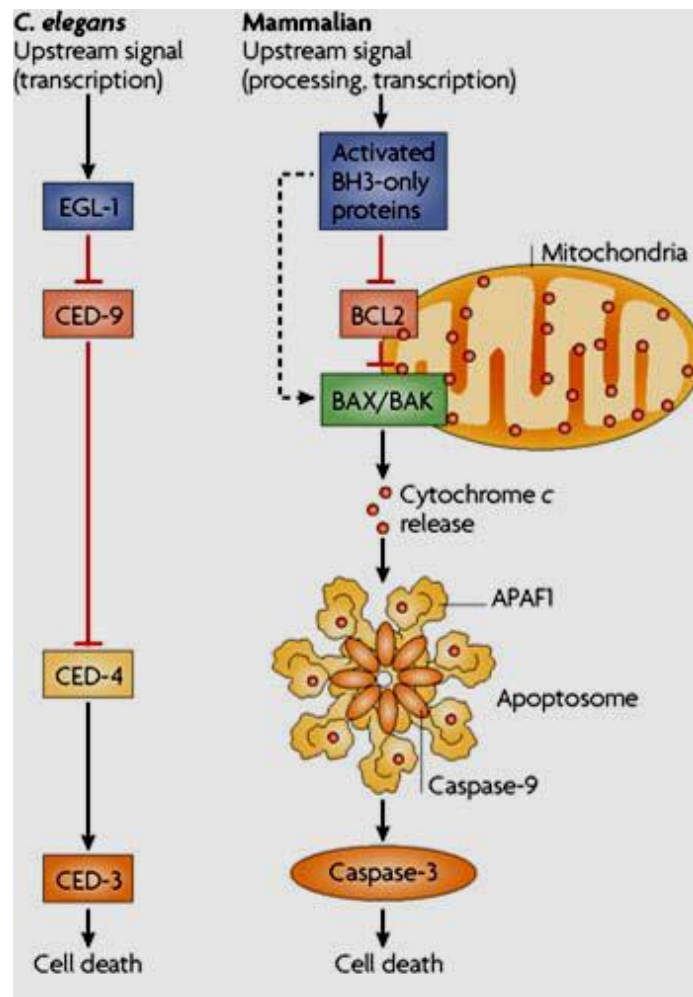
Altres efectes necroptòtics que deriven del dany cel·lular oxidatiu es tradueixen a nivell de desestabilització dels diferents tipus de membranes cel·lulars. La sobrecàrrega de calci citosòlica afavorida pels increments de permeabilitat cel·lular reticular, poden acabar contribuint també a la disfunció mitocondrial. En el procés de mort necroptòtica també es pot afavorir l'actuació de múltiples proteases com ara les calpaïnes, donat un excés de calci citosòlic o bé, les cathepsines, donada per una inducció de la permeabilització membranar dels lisosomes. A més, altres agents cel·lulars poden també contribuir en la desestabilització de les membranes cel·lulars durant el procés de necroptòtica com ara les fosfolipases, les esfingomielinases o de forma específica les calpaïnes en la membrana lisosomal (revisat en (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010)).

### 3. Bioquímica de l'apoptosi: les caspases

#### 3.1. Antecedents moleculars de l'apoptosi en el model cel·lular de *Caenorhabditis elegans*

La principal maquinària molecular descrita implicada en l'execució de l'apoptosi és el conjunt d'enzims proteolítics anomenats caspases (*cysteinyl aspartate-specific proteinases*) (Alnemri, Livingston et al. 1996). El primer membre d'aquesta família es va identificar com a la proteasa responsable del processament proteolític del precursor d'interleukina IL-1 $\beta$  pro-IL-1 $\beta$  anomenat enzim convertidor de d'interleukina-1 $\beta$  (ICE, *interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme*) (Black, Kronheim et al. 1989; Kostura, Tocci et al. 1989). Aquest component més tard, es va purificar i clonar com a caspasa-1 (Cerretti, Kozlosky et al. 1992; Thornberry, Bull et al. 1992). El descobriment i la caracterització inicial de ICE però, no proporcionà cap tipus d'informació rellevant sobre altres proteases similars a ella en el procés de mort cel·lular. L'avanç en la identificació de nous membres de la família de proteases, es va fer gràcies al previ estudi de mecanismes moleculars i genètics de l'apoptosi en el nemàtode *C. elegans* realitzat a finals dels anys 80.





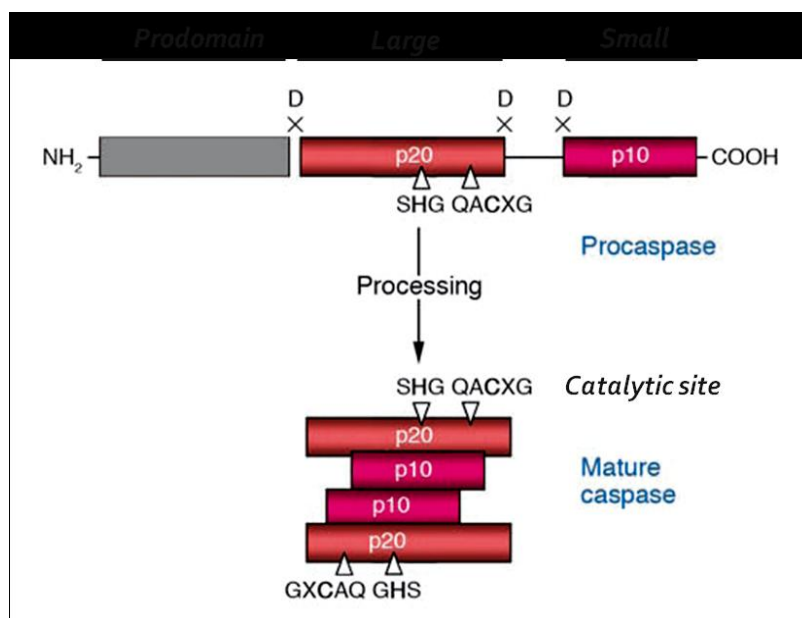
**Figura 135. Expansió evolutiva de la maquinària apoptòtica de *C.elegans* en cèl·lules de mamífers.** Comparació del model apoptòtic trobat en *C.elegans* amb una de les vies principals de l'apoptosi en mamífers. La identificació prèvia dels diferents components apoptòtics trobats en *C.elegans* van permetre trobar els respectius homòlegs com als constituents moleculars més rellevants en la via intrínseca apoptòtica dels mamífers. En el model del nemàtode CED-9 i CED-4 constitueixen un complex proteic que impedeix l'activació de CED-3 a través de CED-4. La mort cel·lular en el nemàtode és inhibida fins que EGL-1 interacciona amb el complex CED-9/CED-4 per permetre l'alliberament de CED-4 i la conseqüent activació de CED-3 amb la final inducció de mort cel·lular (adaptat de (Degtrev and Yuan 2008)).

L'apoptosi en aquest model cel·lular és extremadament precisa, donat que s'activen específicament diferents gens per la inducció del procés de mort cel·lular en 131 cèl·lules somàtiques de les 1019 inicials durant l'etapa de desenvolupament. Aquesta característica bioquímica es va aprofitar per estudiar els mecanismes moleculars que regulaven el procés de mort cel·lular apoptòtic (Ellis, Jacobson et al. 1991). Els resultats de l'estudi van permetre identificar varis gens implicats en la mort apoptòtica (CED-3, CED-4, CED-9 i EGL-1A com a més rellevants) i el seu mecanisme d'actuació en el model cel·lular del nemàtode (Figura 135). A més a més, estudis posteriors van permetre identificar els respectius gens homòlegs en mamífers. Així, CED-3 resultà ser homòleg de la caspasa-3 (Fernandes-Alnemri, Litwack et al. 1994); CED-4 d'Apaf-1 (Zou, Henzel et al. 1997); CED-9 de la proteïna Bcl-2 (Hengartner and Horvitz 1994); i EGL-1 conté una seqüència de 9 aminoàcids similar a la regió homòloga 3 o domini BH3 de les proteïnes de la família Bcl-2, suggerint que podria ser homòleg a membres pro-apoptòtics de la família BH3-only (Conradt and Horvitz 1998) (Figura 135). Pel que fa a la resta de components de la família de caspases en mamífers, aquestes es van identificar més tard, rebent aquest terme unitari de "caspases" per *c* de proteasa amb residu de cisteïna al seu centre actiu, *asp* pel lloc de tall

específic després del residu aspàrtic i *asa* per definir el seu caràcter d'enzim (Alnemri, Livingston et al. 1996).

### 3.2. Propietats moleculars de les caspases: organització estructural

La organització estructural de les caspases és similar dintre de la mateixa família de proteases. La seva síntesi es realitza en forma de zimògens o precursors inactius definits com a pro-caspases amb un pes molecular que varia entre 32-55 kDa. La família de cisteïna proteases consta de tres dominis: un pro-domini N-terminal (entre 3 i 24 kDa), una subunitat llarga anomenada p20 i una subunitat petita C-terminal referida com a p10 (entre 10 i 13 kDa) (Figura I35). En algunes pro-caspases, la subunitat llarga i la petita es troben separades per una seqüència de curta unió. L'activitat catalítica de la caspasa es troba regulada per la cisteïna del seu centre actiu present en forma d'un pentapeptid altament conservat QACXG (Gln-Ala-Cys-X-Gly), on X és Q per la caspasa-8 i -10, G per la caspasa-9 i R (Arg) per la resta de caspases. L'activitat de les caspases consisteix en la proteòlisi específica de determinats substractes executada després dels seus residus d'àcid aspàrtic (revisat en (Thornberry and Lazebnik 1998)).

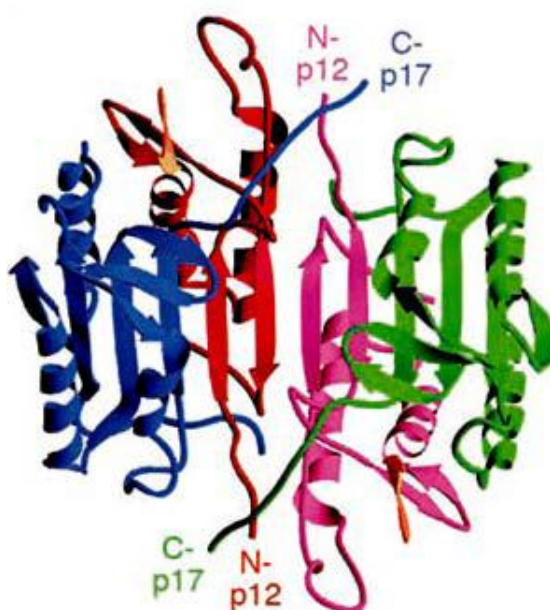


**Figura I36. Mecanisme de formació de l'heterotetràmer per la constitució de la forma activa de la caspasa.** El tall específic en els enllaços d'àcid aspàrtic (D) condueix a la formació de l'heterotetràmer p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub> i a l'alliberament en paral·lel del pro-domini. Les fletxes indiquen els residus implicats en la formació del centre actiu (modificat de (Lavrik, Golks et al. 2005)).

La constitució de la forma madura de la caspasa es caracteritza per la formació de l'heterotetràmer (p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub>), el qual resulta del tall específic en els enllaços d'àcid aspàrtic que, al seu torn, també acaben causant l'alliberament del prodomini. D'aquesta manera, la formació del tetràmer deriva de la homodimerització dels dos heterodímers constituïts per la subunitat llarga i curta (Figura I36) (Rotonda, Nicholson et al. 1996; Thornberry 1998). De forma més específica, les subunitats de cada heterodímer (p20-p10) es troben constituïdes per interaccions hidrofòbiques de manera que es pleguen en un cilindre compacte mitjançant 6 fulles β antiparal·leles centrals. La interacció entre els dos heterodímers es produeix a través de les 12 fulles β que es troben

envoltades per 5 hèlixs  $\alpha$  distribuïdes en cares oposades del pla format per les fulles  $\beta$  (revisat en (Fuentes-Prior and Salvesen 2004)).

Els dos heterodímers del tetràmer s'alineen en una configuració cua-cap que permet situar els dos centres 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 I37). Aquesta configuració del tetràmer permet un mecanisme d'activació de la proteasa afavorit per la proximitat entre l'extrem C-terminal de la subunitat llarga i l'extrem N-terminal de la subunitat petita de l'heterodímer oposat. D'altra banda, la configuració del tetràmer també permet que certs residus de cisteïna i glicina presents en la subunitat petita, estabilitzin per ponts d'hidrogen l'estat de transició cap a la formació del tetràmer actiu (Wilson, Black et al. 1994).



**Figura I37. Estructura de l'heterotetràmer de caspasa-3.** El tetràmer està compost de dos dominis catalítics dels dos heterodímers. Els extrems N- i C-terminal de les subunitats petita i llarga són indicats. (modificat de (Lavrik, Golks et al. 2005)).

### 3.3. Tipus i criteris de classificació

En humans s'han acabat identificant 11 caspases que inclouen des de caspasa-1 a caspasa-10 i caspasa-14 (Alnemri, Livingston et al. 1996; Pistritto, Jost et al. 2002). La proteïna inicialment denominada caspasa-13 resultà ser l'homòleg boví de la caspasa-4, mentre que les caspases-11 i 12 es van descriure en ratolí com a homòlegs de la caspasa-4 i -5 humana (Koenig, Eckhart et al. 2001; Degterev, Boyce et al. 2003). La família de proteases es pot classificar segons l'especificitat proteolítica del substracte, el tamany del seu prodmini o segons la seva funcionalitat.

#### 3.3.1. Especificitat proteolítica

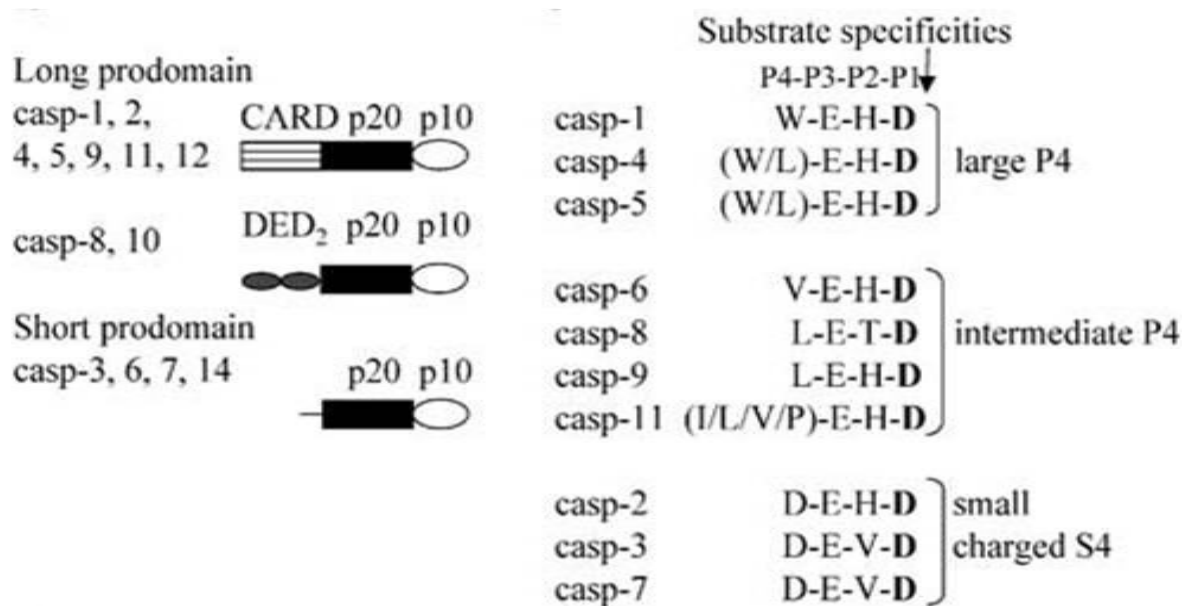
Les caspases reconeixen una seqüència tetrapeptídica específica en les seves proteïnes diana a processar. Els llocs d'unió als substractes són similars dins de la mateixa família de proteases. S'han reportat 4 llocs d'unió principals: S1, S2, S3 i S4. Malgrat tant la subunitat llarga

com la petita aporten residus d'aminoàcids als diferents llocs d'unió del substrate, els determinants principals que defineixen l'especificitat del substrate de les caspases es troben localitzats a la subunitat petita (Nicholson 1999). A més, les caspases a part de requerir pel seu tall proteolític un residu d'àcid aspàrtic en el substrate (posició P1), són selectives en el reconeixement de com a mínim 3 residus situats en l'extrem amino de l'àcid aspàrtic (Stennicke, Renatus et al. 2000). Els residus d'aminoàcids presents en aquestes tres posicions (P2, P3 i P4) varien dintre de la mateixa família degut a què S1 és l'únic lloc d'unió que es troba altament conservat entre les diferents caspases. Malgrat totes les cisteïna proteases presentin especificitat pel residu d'àcid aspàrtic (Asp) en la realització del seu tall proteolític, s'ha establert una preferència d'unió en funció de l'aminoàcid que ocupa la posició 4 (P4) en sentit amino terminal respecte al residu d'Asp que serà processat. Segons el residu present en P4, es va establir una classificació de les caspases per mitjà d'assajos d'especificitat amb diversos substrates (Rano, Timkey et al. 1997; Thornberry 1997).

La classificació per especificitat proteolítica acaba agrupant les caspases en 3 grups. El primer grup inclou les caspases 1, 4 i 5 amb una alta afinitat per un aminoàcid en P4 de caire hidrofòbic, com per exemple leucina (L) o triptòfan (W). El segon grup comprén les caspases 6, 8, 9 i 11 amb una preferència marcada per reconèixer residus d'aminoàcids amb cadenes alifàtiques. L'últim grup amb les caspases 2, 3 i 7 presenten una activitat màxima quan la posició P4 s'ocupa per Asp (Figura I38).

### 3.3.2. Llargada del pro-domini

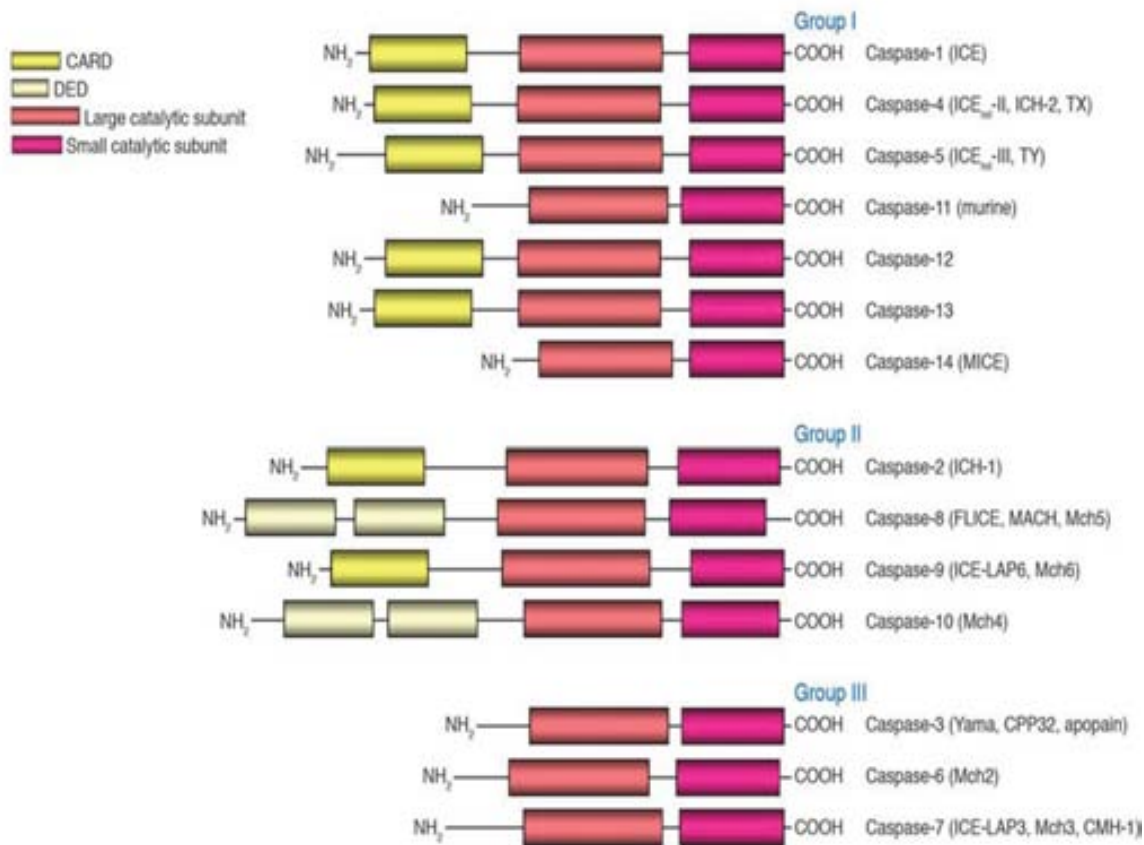
Les caspases també es poden classificar segons la llargada del pro-domini en dos grups: caspases de pro-domini llarg (amb més de 90 aminoàcids) que inclouen caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 i -12; i caspases de pro-domini curt (entre 20-30 aminoàcids) com les caspases -3, -6, -7 i -14 (Figura I37). Les proteïnes amb pro-domini llarg contenen els dominis d'interacció proteïca DED o CARD, ja sigui per permetre en una cas la interacció de la caspasa amb els receptors de mort a través d'una molècula adaptadora o bé, per constituir complexos macromoleculars determinants en la transmissió de la senyal apoptòtica o inflamatòria segons el cas (Cryns and Yuan 1998; Martinon and Tschopp 2007). Per altra banda, s'ha reportat el cas d'una nova proteasa (caspasa-15) caracteritzada per tenir els dos pro-dominis de DED i CARD i identificada en alguns mamífers (en gos i porc), tot i que és absent tant al genoma humà com al de ratolí (Eckhart, Ballaun et al. 2005).



**Figura I38.** Classificació de les caspases segons la llargada del pro-domini i l'especificitat de tall proteolític en el substrate. A l'esquerra, caspases agrupades pel criteri de llargada del pro-domini amb els diferents tipus de domini i subunitats indicats en cada cas. A la dreta, distinció de les caspases segons la seva preferència de reconeixement del residu d'aminoàcid ocupat en la posició P4 del substrate (modificat de (Degterev, Boyce et al. 2003)).

### 3.3.3. Funcionalitat

Aquest darrer criteri de classificació durant molt de temps va distingir les caspases en “pro-apoptòtiques” i “pro-inflamatòries”. Aquesta classificació encara segueix sent en part vigent, malgrat s’ha descrit que la major part de les caspases apoptòtiques (caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10) tenen algun tipus de funció en processos no apoptòtics (Vakifahmetoglu-Norberg and Zhivotovsky 2010; Zeuner, Eramo et al. 1999). De la mateixa manera, s’ha observat que membres típics de la classe pro-inflamatòria (caspasa-1, -4 i -5) són capaces d’induir piroptosi com a una mort cel·lular inflamatòria (Fernandes-Alnemri, Wu et al. 2007; Labbe and Saleh 2008). No obstant, la classificació per funcionalitat actual distingeix dintre dels membres apoptòtics entre les caspases iniciadores (caspases -2, -8, -9 i -10) i les caspases efectores o excutores (caspases -3, -6 i -7) (Figura I39). Les caspases iniciadores en general presenten pro-dominis llargs i es troben al principi del desencadenament de la via de senyalització apoptòtica, on caspasa-8 i -10 actuen a nivell de via extrínseca i caspasa-2 i -9 d’intrínseca. Aquest tipus de caspases tenen a més, una especificitat de tall per les caspases efectores sent les responsables de la seva activació. Per contra, les caspases efectores posseeixen un pro-domini curt i la seva especificitat de tall correspon a un gran nombre de substractes proteolitzats durant l’apoptosi (Cryns and Yuan 1998).



**Figura I39. Classificació de les caspases per funcionalitat.** Es distingeixen membres inflamatoris (grup I), membres apoptòtics iniciadors o activadors (grup II) i membres apoptòtics executors o efectors (grup III) (modificat de (Lavrik, Golks et al. 2005)).

### 3.4. Mecanismes d'activació

Les dades estructurals actuals indiquen que tant les conformacions dels zimògens com les de les seves formes actives són similars dintre de la mateixa família de proteases. No obstant, la transició entre el zimògen i la forma activa succeeix a través de mecanismes diferents entre les caspases iniciadores i les caspases efectores.

#### 3.4.1. Caspases iniciadores: activació per dimerització

En estat inactiu, les caspases iniciadores romanen com a monòmers inactius que requereixen de la homodimerització per aconseguir la seva activació (Figura I40). El procés de dimerització en les caspases iniciadores s'afavoreix pel previ reclutament d'aquestes a través dels seus pro-dòmens DED i CARD, en plataformes proteïques constituïdes fruit de la resposta d'un estímul apoptòtic. L'increment local de la concentració de caspasa provocat per aquest reclutament, acaba promovent el fenomen de la dimerització, donada la proximitat de les diferents molècules de caspasa iniciadora (Salvesen and Dixit 1999). Cada caspasa iniciadora és capaç de constituir la seva plataforma d'activació sent DISC pel cas de reclutament i activació de caspasa-8 i -10, o les plataformes de l'apoptosoma i el PIDDOSoma pel reclutament i activació de caspasa-9 i -2 respectivament (Cryns and Yuan 1998; Li, Nijhawan et al. 1997; Berube, Boucher et al. 2005).

D'altra banda, les caspases pro-inflamatòries s'activen per un mecanisme d'inducció similar al de dimerització de les caspases iniciadores. En aquest cas, els complexos proteïcs

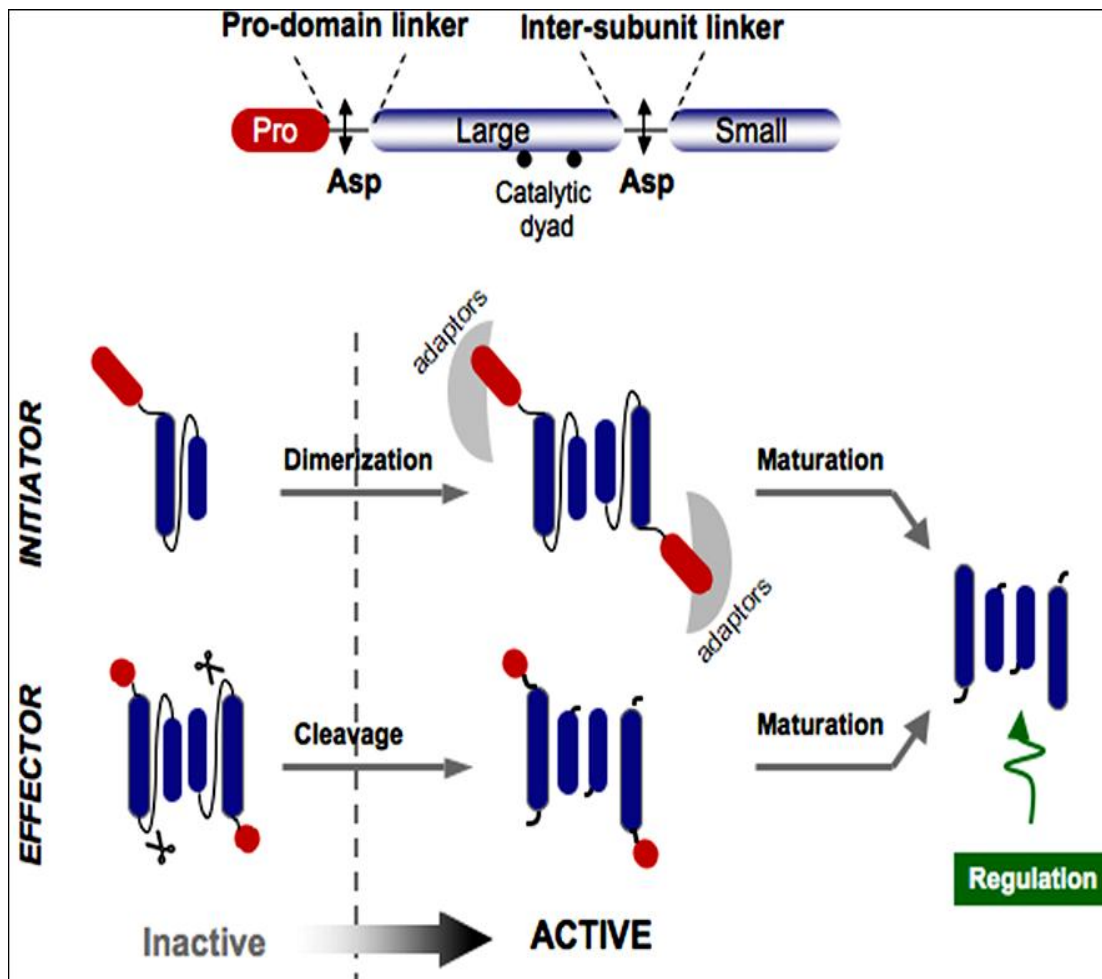
d'activació s'anomenen inflamosomes i posseeixen una alta afinitat pel pro-domini CARD, present en les caspases inflamatòries -1, -4 i -5. Tot i així, no acaba d'estar molt clar si el mecanisme d'activació de les caspases pro-inflamatòries succeeix a través de la homodimerització o si resulta de la heterodimerització amb altres components de l'inflamasma (Sidiropoulos, Goulielmos et al. 2008).

### **3.4.2. Caspases executores: activació per escissió**

A diferència de les caspases iniciadores, les caspases executores romanen com a dímers inactius i requereixen del processament del domini catalític per convertir-se en la forma activa. La dimerització en el cas de les caspases efectores succeeix immediatament després de la seva síntesi com a zimògens, però es mantenen inactives fins que pateixen una escissió en cada una de les seqüències que separen la subunitat gran i la petita (Figura I40).

### **3.4.3. Maduració proteolítica**

El procés d'activació tant en caspases iniciadores com executores es consolida amb el posterior procés de maduració proteolítica. Els esdeveniments de maduració impliquen l'eliminació del pro-domini i el processament proteolític de la seqüència d'unió entre les subunitats llarga i petita, en el cas de les caspases iniciadores (Pop, Fitzgerald et al. 2007) (Figura I40). Aquest procés de maduració proteolítica és opcional i permet la generació de diferents neo-epítops que poden derivar a diferents conseqüències funcionals cel·lulars. Així per exemple, la dimerització de la caspasa-8 en absència de maduració proteolítica produeix una forma activa capaç de desencadenar una senyalització de proliferació i activació de limfòcits T sense provocar mort cel·lular. La inducció del procés de mort cel·lular en canvi, requereix del processament complet de caspasa-8 (Kang, Oh et al. 2008). En aquest cas, l'autoprocessament de caspasa-8 induït per assolir el procés complet de maduració, permet a la proteasa de mantenir-se activa al citosol un cop s'ha alliberat del DISC (Pop, Fitzgerald et al. 2007; Salvesen and Dixit 1999). En qualsevol cas, el procés de maduració proteolítica pretén establir la caspasa i promoure esdeveniments de regulació específics que acabin induint la mort cel·lular (Pop, Fitzgerald et al. 2007).



**Figura 140. 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. Les caspases executores en canvi, es troben ja en forma de dímers i són activades pel processament proteolític entre les regions d'unió de les subunitats llarga i petita. L'activació de les caspases es completa amb esdeveniments de maduració proteolítica que estableixen la caspasa i la pre-disposen als processos de regulació (font: (Pop and Salvesen 2009)).

### 3.5. Substrates cel·lulars de les caspases

En un primer moment, la majoria de substrates es van dividir en diversos grups funcionals (Stroh and Schulze-Osthoff 1998). La classificació es basava en distingir entre:

- 1) Proteïnes estructurals com ara  $\alpha$ -Actina, BAP31, caderinas, FAK, Gelsolina, Lamina A/C, Lamina B1 y B2, ROCK-1,  $\alpha$ -Fodrina, tubulina, vimentina.
- 2) Proteïnes reguladores de la replicació, transcripció, traducció i reparació de l'ADN. Entre les que s'engloben com a més rellevants: PARP, ADN-PKCs, Topoisomerasas I y II, Histones, MCM3, SP1, SAF-A, ATM, c-Rel, CREB, eIFs, hnRPs, U1-70kDa, ICAD/DFP45, NF $\kappa$ B p50, RIP1, STAB1 i SnRNP70, entre d'altres.
- 3) Proteïnes quinasa i altres tipus de molècules implicades en vies senyalització entre les que destaquen: AKT, Bid, Cdc42, Claspin, MEK, MEKK1, MST1-3, PAK2, PKCs, PLC $\gamma$ 1, PP2A, ROCK1, Src, TRAF1 i TRAF3.

No obstant, el nombre de substrates de caspases ha anat incrementant de forma considerable. Posteriorment a la inicial classificació, els múltiples substrates específics de



caspses reportats es van dividir bàsicament en dos tipus: substractes amb un guany de funcionalitat després del seu tall proteolític, com és el cas de les caspses executores al ser processades per altres membres de la família de proteases; i substractes amb una pèrdua de funció a conseqüència de l'escisió executada per la caspasa, com és el cas de la proteïna ICAD al deixar d'inhibir l'endonucleasa CAD. El processament proteolític de les caspses en els seus substractes, s'associa a la inducció de canvis conformacionals o moleculars en les propietats intrínseques del substracte proteolitzat determinants en el guany o pèrdua de la seva funcionalitat. L'escisió proteolítica pot implicar des de l'eliminació d'un domini regulador, l'activació d'un zimògen o la dissociació de dominis actius (Timmer and Salvesen 2007).

No obstant, el continu creixement de substractes específics de caspses acabà portant a la creació d'una base de dades *online* anomenada CASBASH (*caspase substrate database homepage*) amb tots els substractes de caspses reportats en mamífers que a més, inclou els llocs de tall de les proteases (<http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/>) (Luthi and Martin 2007). A més a més, recentment s'han descrit mètodes informàtics que prediuen tots els possibles llocs de processament de les caspses en múltiples proteïnes (Piippo, Lietzen et al. 2010; Song, Tan et al. 2010).

Com a substractes específics de les caspses executores en destaquen els següents: la proteïna del citoesquelet  $\alpha$ -fodrina i la proteïna ICAD inhibidora de la endonucleasa CAD, com a substractes específics de caspasa-3; les lamines A i C, com a substracte de caspasa-6; i la co-chaperona p23, com a substracte específic de caspasa-7 (Janicke, Ng et al. 1998; Tang and Kidd 1998; Halawani, Tessier et al. 2010; Orth, Chinnaiyan et al. 1996; Walsh, Cullen et al. 2008).

Pel que fa a la proteïna del citoesquelet  $\alpha$ -fodrina, s'ha vist que aquesta es processa durant l'apoptosi generant un fragment específic pel tall proteolític de caspasa-3 de 120 kDa a través del reconeixement del tetrapèptid DETD1185 (Janicke, Ng et al. 1998). No obstant, aquesta proteïna durant l'apoptosi genera uns altres dos fragments de 145 i 150 kDa degut a l'activació de les calpaines. Tot i així, també s'ha vist que el fragment de 145 kDa es pot generar per caspasa-3. En qualsevol cas, el processament apoptòtic de la fodrina acaba afavorint a l'aparició del *blebbing* apoptòtic. ICAD com a un altre substracte rellevant de caspasa-3, destaca per la seva contribució en la inducció de la fragmentació de l'ADN a través de l'alliberament de l'endonucleasa CAD com a responsable d'aquesta degradació. S'han descrit dues isoformes d'ICAD, ICAD llarga com a ICAD-L i ICAD curta com a ICAD-S amb pesos moleculars de 45 i 35 kDa respectivament. Totes dues isoformes es processen en rebre un estímul apoptòtic per caspasa-3 generant un major fragment C-terminal de 24 kDa per ICAD-L i 18 kDa per ICAD-S. Aquests fragments però, es procesen de nou generant un fragment d'11 i 4 kDa per ICAD-L i ICAD-S respectivament. Aquest últim processament es realitza a través del reconeixement del tetrapèptid DAVD224. La generació del fragment d'11 kDa provinent del segon tall proteolític executat en la isoforma de la ICAD llarga, és el que determina l'alliberament i l'activació de l'endonucleasa CAD per la inducció de la fragmentació de l'ADN (Tang and Kidd 1998).

Les lamines A/C com a substractes de caspasa-6, són productes d'splicing alternatiu i actuen com a components estructurals de la membrana nuclear (Guilly, Bensussan et al. 1987). El tamany de les lamines A/C és de 70 i 65 kDa respectivament i el seu processament apoptòtic genera un fragment de 42 i 37 kDa per a cada una de les isoformes respectives (Orth, Chinnaiyan et al. 1996). El tetrapèptid reconegut en aquest cas per caspasa-6 és VEID230. A més, s'ha observat que la mutació de la lamina que implica la seva resistència al tall proteolític pot impedir o

endarrerir certes característiques apoptòtiques com ara la condensació de la cromatina i la fragmentació de l'ADN en forma de *ladder* (Rao, Perez et al. 1996).

Pel que fa a p23, la identificació de la co-xaperona com a substracte específic de caspasa-7, permet distingir l'activació d'aquesta caspasa respecte la de caspasa-3, fet que és rellevant donada la similitud d'activitat proteolítica de les dues caspases executores (Walsh, Cullen et al. 2008). El processament proteolític de p23 acaba generant un fragment específic de 17 kDa.

### 3.6. Regulació de l'activitat de les caspases

#### 3.6.1. Inhibidors endògens

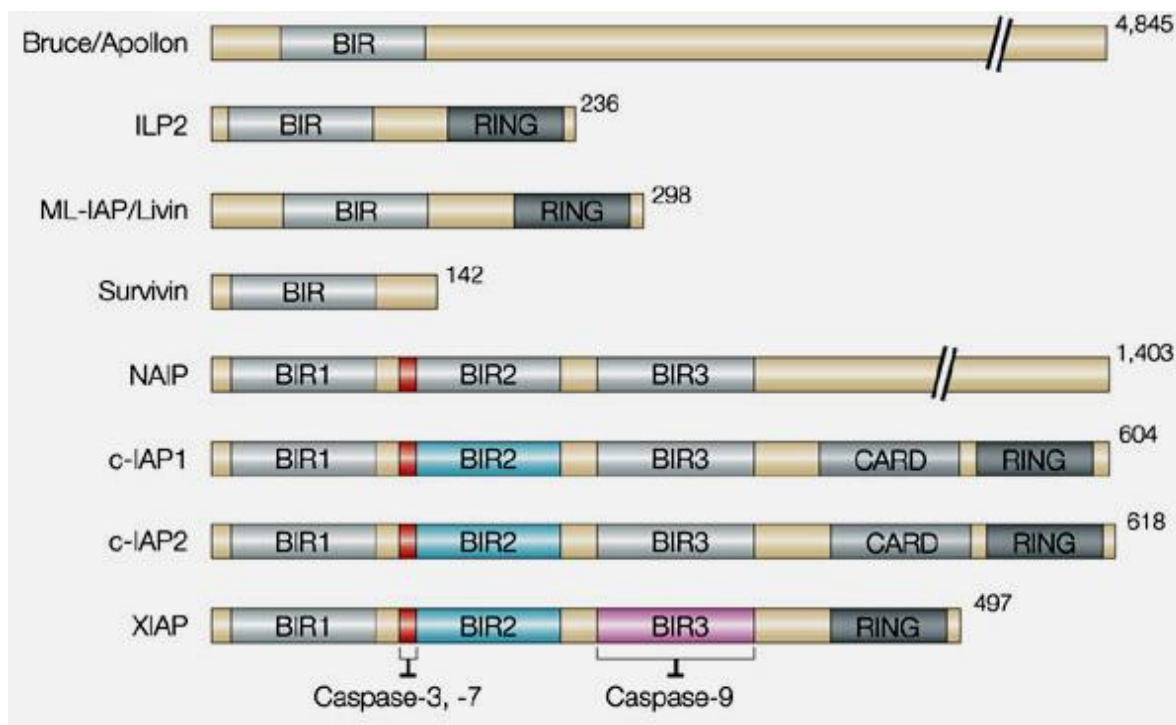
Els principals inhibidors endògens de les caspases engloben principalment la família de les IAPs, com a molècules inhibidores tant de caspases iniciadores com efectores; i la proteïna FLIP, inhibidora a nivell de la constitució del DISC en l'etapa inicial de desencadenament de la senyal apoptòtica extrínseca (Crook, Clem et al. 1993; Micheau and Tschopp 2003).

Les IAPs constitueixen una família composta per varis membres (Figura I41). En humans, els components d'aquesta família millor caracteritzats són la proteïna XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP (neuronal IAP) i survivina (Schimmer 2004). Tots els components es caracteritzen per tenir una seqüència d'aminoàcids altament conservada denominada BIR (*baculoviral IAP repeats*) a través de la qual inhibeixen les caspases. En mamífers, tots els tipus de proteïnes IAPs contenen en la seva regió N-terminal tres dominis BIR (BIR1, BIR2 i BIR3) excepte la survivina que únicament posseïx un domini BIR (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

Entre els diferents components de les IAPs, XIAP és l'únic component capaç d'inhibir de forma directa les caspases (Eckelman, Salvesen et al. 2006). En concret, s'uneix i inhibeix les caspases-3, -7 i -9 (Riedl, Ratus et al. 2001; Shiozaki, Chai et al. 2003). cIAP1 i cIAP2 s'uneixen a les caspases, però executen un mecanisme d'inhibició indirecte per ubiquitinació que acaba implicant la degradació proteosomal de les proteases (Eckelman and Salvesen 2006; Huang, Joazeiro et al. 2000; Choi, Butterworth et al. 2009). La presència del domini RING en la part C-terminal de les IAPs, és la que determina una activitat de poliubiquitinació de les caspases -3 i -7 actuant com a enzim ubiquitina lligasa i conduint-les en conseqüència, a la seva posterior degradació o inactivació no degradativa (Huang, Joazeiro et al. 2000; Choi, Butterworth et al. 2009; Schimmer 2004). Els dominis RING però, no solament aporten una activitat d'ubiquitinació sinó que també permeten a les IAPs constituir homo i heterodímers amb les proteases (Mace, Linke et al. 2008). No obstant, XIAP també presenta un domini RING que *in vivo* sembla requerir, a part dels seus dominis BIR, per executar de forma completa la seva activitat antiapoptòtica (Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008).

FLIP presenta un rang d'inhibició menor de les caspases en comparació a la família de les IAPs. El seu efecte antiapoptòtic principal consisteix en impedir l'activació de les pro-caspases iniciadores -8 i/o -10 a nivell de la plataforma DISC. FLIP posseïx en la seva regió N-terminal 2 motius DED que competeixen amb la pro-caspasa-8 per la unió amb la molècula adaptadora FADD (Scaffidi, Schmitz et al. 1999). Existeixen dues isoformes de l'inhibidor: FLIP-S, com a la forma curta amb un pes molecular de 26 kDa; i FLIP-L, com a la forma llarga amb 55 kDa. FLIP-S presenta en la seva regió C-terminal una cua de 20 aminoàcids determinants per la seva

ubiquitinació i degradació proteosomal, mentre que FLIP-L conté un domini *caspase-like* que manca d'activitat enzimàtica (Bagnoli, Canevari et al. 2009).



**Figura 141. Família de proteïnes de les IAPs.** S'inclouen les proteïnes XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, ILP2 (*IAP-like protein-2*), ML-IAP (*melanoma IAP*)/Livin, NAIP (*neuronal apoptosis-inhibitory protein*) i survivina. Tots els components es caracteritzen per tenir almenys un domini BIR i alguns posseeixen també un domini CARD i/o RING. El pèptid que precedeix el domini BIR2 de XIAP, cIAP1 i cIAP2 és responsable de la inhibició de caspasa-3 i -7 mentre que el domini BIR3, només en el cas de XIAP, és capaç d'assolir una potent inhibició per caspasa-9. Els dominis BIR caracteritzats bioquímicament i amb funcions conegudes són indicats en color, mentre que la resta de dominis no caracteritzats es mostren en gris (font: (Shi 2001)).

### 3.6.2. Inhibidors químics

Existeixen també inhibidors de caspases a nivell químic. El disseny d'aquest tipus de compostos es basa en la presència dels diferents tipus de tetrapèptids de substractes segons el tipus de proteasa que executa el tall proteolític (Figura I38). Aquest tipus de compostos a més, contenen en la porció C-terminal modificacions que permeten la obtenció d'antagonistes de caspases tant reversibles com irreversibles. No obstant, la major part d'aquests inhibidors químics són hidrofòbics i poc permeables i poden inclús, produir efectes tòxics inespecífics en concentracions requerides per la inhibició de les caspases (Degtrev, Boyce et al. 2003).

S'han generat tot tipus de pèptids inhibidors constituïts en la seqüència del tetrapèptid per només un residu aspàrtic (Boc-Asp-FMK), o bé per dipèptids (Q-Val-Asp-OPh), tripèptids (Boc-Val-Ala-Asp-FMK), tetrapèptids (Z-Tyr-Val-Ala-Asp-FMK) i inclús, pentapèptids (Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-FMK). Entre els inhibidors irreversibles destaquen varies formes químiques com els adheids (-CHO), els nitrils (-CN) i les cetones (-COR) que permeten actuar a l'inhibidor com a pseudosubstrate per la caspasa activa sense arribar-la alterar químicament (Ekert, Silke et al. 1999). Els inhibidors actuen de forma competitiva constituint enllaços covalents amb la cisteïna catalítica. D'altra banda, els inhibidors de caspasa irreversibles inclouen formes químiques com les diazometilcetones (-N2), aciloximetilcetones (-OCOR) i les halometilcetones (-Cl, -F) (Ekert, Silke et al. 1999). Entre les formes més recurrents d'inhibidors però, destaquen com a inhibidors de

caspases iniciadores i efectores la forma química d'aldehid Ac-IETD-CHO i Ac-DEVD-CHO respectivament, mentres que les caspases pro-inflamatòries s'inhibeixen en una altra forma d'aldehid Ac-WEHD-CHO (Garcia-Calvo, Peterson et al. 1998). No obstant, l'inhibidor actual de caspases més efectiu és una forma química que conté el grup O-fenoxi en la part C-terminal, que juntament amb la presència d'un grup quinolil en la part N-terminal, millora de forma significativa l'eficàcia del pèptid inhibidor de caspases. El grup O-fenoxi permet a aquesta forma química una major reactivitat en el residu de cisteïna de la caspasa, que es tradueix en una efectivitat d'inhibició de la caspasa superior. Pel que fa a la presència del grup quinolil N-terminal, aquest també contribueix a la millora de l'efectivitat d'inhibició, donat que incrementa la permeabilitat cel·lular de la forma química i disminueix, al seu torn, la dosi requerida del pèptid inhibidor. Aquest tipus d'inhibidor es distingeix com a un inhibidor d'ampli espectre d'activitat enzimàtica de caspases competitiu i irreversible. L'exemple més rellevant d'aquest tipus de compostos és l'inhibidor Q-VD-OPh (quinolil-valil-O-metilaspartil-[2,6-difluorofenoxi]-metilcetona), capaç d'inhibir de forma efectiva l'activitat de caspasa i que, en comparació per exemple a l'inhibidor Boc-D-FMK, requereix utilitzar-se a una concentració deu cops inferior (Caserta, Smith et al. 2003).

Un altre inhibidor d'ampli espectre també utilitzat de forma recurrent és el denominat z-VAD-FMK amb la peculiaritat però, que aquest compost és capaç també d'inhibir calpaïnes i cathepsines. L'efecte inespecífic d'aquest inhibidor es deu a la presència d'halometilcetones com a molècules més reactives que els derivats d'aldehids, pel que fàcilment s'acaben inhibint altres proteases de tipus cisteïna (Ekert, Silke et al. 1999).

Malgrat l'alta efectivitat d'inhibició d'aquests compostos, el principal inconvenient és la baixa selectivitat i especificitat d'inhibició entre els diferents membres de la família de caspases (Degterev, Boyce et al. 2003; Pereira and Song 2008).

### 3.6.3. Inhibició per ROS

Les caspases requereixen d'un ambient químic reduït per tal d'activar-se de forma correcta, donat que contenen una cisteïna en el seu centre actiu altament susceptible d'oxidació per la presència del grup tiol o sulfidril (-SH) en el residu aminoacídic. De fet, Hampton i els seus col·laboradors van establir que segons el llinar de ROS produït en l'ambient cel·lular, les caspases podien romandre activades o inhibides. Els seus estudis rebelaren que amb l'ús de diferents concentracions exògenes de peròxid d'hidrogen, es podien induir diferents tipus de mort. Així, dosis baixes de l'oxidant podien activar les caspases i desencadenar la mort apoptòtica, mentre que dosis elevades podien inactivar les proteases sometent a la cèl·lula a una mort necròtica (Groeger, Quiney et al. 2009; Hampton and Orrenius 1997).

En concret, s'ha reportat que en condicions menors de tractament de peròxid d'hidrogen, l'activació de caspases succeïa de forma indirecta, donat que les proteases no eren activades en extractes citoplasmàtics tractats amb l'agent oxidant (Hampton, Fadeel et al. 1998). L'activació de caspases per aquest menor llinar de ROS es va acabar associant amb l'alliberament de citocrom C i la constitució de la seva plataforma apoptosòmica, amb el conseqüent desencadenament d'activació de les caspases efectores (Stridh, Kimland et al. 1998). Per altra banda, la inducció de l'alliberament d'aquest factor mitocondrial pro-apoptogènic va acabar sent relacionat amb l'obertura del porus PTPC de la mitocondria en condicions d'estrès oxidatiu (Hampton, Fadeel et al. 1998; Costantini, Belzacq et al. 2000). No obstant, altres exemples d'activació de caspases en una mort apoptòtica es descriuen per un menor llinar de ROS produït, però, de forma intracel·lular

i no addicionat de manera exògena. És el cas, per exemple, de l'apoptosi mediada per p53, on el supressor tumoral entre els múltiples gens que pot activar, pot induir la transcripció de factors pro-oxidants iniciadors d'activació de caspases per mecanismes similars als esmentats (Polyak, Xia et al. 1997).

D'altra banda, els estudis de Hampton també mostren la inactivació de les caspases i el conseqüent desencadenament de la mort necròtica en condicions d'un elevat estrès oxidatiu, donada la pèrdua de la funcionalitat del grup tiol de la cisteïna catalítica. De fet, la inactivació de les caspases per ROS, juntament amb el pas de mort apoptòtica a necròtica, es descriu de manera dosi dependent en el tractament exògen de varis agents pro-oxidants (Dydbukt, Ankarcona et al. 1994). Inclús, s'ha arribat a detectar un bloqueig temporal de les caspases en una co-estimulació de peròxid d'hidrogen i el lligand de mort Fas. En aquest cas, la inhibició de les caspases per ROS es produeix de forma reversible, donat que aquest model de mort és capaç de reestablir l'activació de les proteases i restablir la mort apoptòtica (Hampton and Orrenius 1997).

#### **4. Degradació de l'ADN durant l'apoptosi**

##### **4.1. Tipus de fragmentació i canvis nuclears**

La fragmentació de l'ADN és una de les principals característiques bioquímiques de l'apoptosi (Wyllie 1980). El procés de fragmentació apoptòtica de l'ADN es realitza en dues etapes. En la primera, l'ADN es degrada en fragments d'alt pes molecular (50-300 kb) (Walker, Leblanc et al. 1999). Aquest tipus de fragmentació s'anomena HMW (*high molecular weight*) i coincideix amb l'aparició dels primers canvis nuclears apoptòtics caracteritzats per una condensació marginal de la cromatina molt feble (morfologia tipus I). Posteriorment a aquesta primera degradació de l'ADN, la fragmentació es realitza de forma oligonucleosomal o internucleosomal. En aquest tipus de fragmentació, l'ADN es degrada preferentment en les regions internucleosomals generant fragments d'aproximadament 180 pb o múltiples d'aquests (Lecoeur 2002). Aquest tipus de degradació en fragments de baix pes molecular o altrament coneguda com a LMW (*low molecular weight*) o *ladder*, és concomitant amb un estat de condensació de la cromatina més avançat, i visualitzat en masses arrodonides altament empaquetades (morfologia nuclear de tipus II o morfologia apoptòtica clàssica) (Lecoeur 2002).

Malgrat, però, que la fragmentació de l'ADN HMW precedeix normalment a la fragmentació LMW, existeixen evidències que l'apoptosi pot succeir igualment en absència de la degradació oligonucleosomal de l'ADN (Boix, Llecha et al. 1997; Iguchi, Hirano et al. 2002; Oberhammer, Wilson et al. 1993; Yuste, Bayascas et al. 2001). Per altra banda, cal afegir que la degradació de l'ADN HMW es descriu, inclús, en cèl·lules en creixement mentre que la fragmentació oligonucleosomal és exclusiva de la mort apoptòtica (Solov'yan, Andreev et al. 1997; Szabo 1995).

##### **4.2. Endonucleases implicades en la fragmentació de l'ADN**

###### **4.2.1. Tipus d'endonucleases**

Les endonucleases són la principal maquinària enzimàtica implicada en la fragmentació de l'ADN. Tot i que alguns autors consideren la idea que la degradació de l'ADN és un procés que succeeix de forma passiva en la mort apoptòtica, s'ha demostrat que la inhibició de les endonucleases pot arribar a endarrerir i inclús evitar, l'apoptosi cel·lular (Bai, Saafi et al. 1999).

Des del punt de vista funcional, les endonucleases implicades en la fragmentació apoptòtica de l'ADN es distingeixen en dos tipus:

1. **Nucleases autònomes** cel·lulars, com a endonucleases capaces de degradar l'ADN de la pròpia cèl·lula. Aquest tipus de nucleases poden accedir directament al nucleoplasma per tal de degradar l'ADN.
2. **Nucleases de gestió de residus**, implicades en la degradació de l'ADN exògen provinent d'una altra cèl·lula. Aquest segon tipus d'endonucleases, en canvi, es sintetitzen al reticle endoplasmàtic rugós i posteriorment es localitzen als lisosomes o bé, es secreten a l'espai extracel·lular.

Examples of nucleases and cofactors that are involved in apoptotic DNA degradation							
Type	Optimal pH	Cofactor	Substrate preference	TUNEL*	Location	References	
<b>Cell-autonomous nuclease or cofactor</b>							
CAD/DF40/CPAN	HMW, LMW	7.5	Mg <sup>2+</sup>	dsDNA	+	Nuclei, cytoplasm	23,24,43
Endonuclease G	HMW, LMW	6–9	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	ssDNA, RNA	+	Mitochondria	60,63
DNase $\gamma$ /DNAS1L3	HMW, LMW	7.2	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	ssDNA, dsDNA	+	Nuclei	69,145
L-DNase II	LMW	Acidic	ND	ND	ND	Cytoplasm	113
Topoisomerase II	HMW	ND	ND	dsDNA	+	Nuclei	20,110, 112
Cyclophilins	HMW	7.5–9.5	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	ssDNA, dsDNA	+	Nuclei, cytoplasm	146
AIF (cofactor)	HMW	ND	ND	ND	ND	Mitochondria	11
NM23-H1	ss nicks	ND	ND	ND	ND	ER	147
DNase I		7–8	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	ssDNA, dsDNA	+	-	26
<b>Waste-management nuclease</b>							
DNase II		4.5–5.5	None	ssDNA, dsDNA	-	Lysosome	83
DNase I		7–8	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	ssDNA, dsDNA	+	Secreted	69

\*The '+' symbol indicates that the nuclease generates 5'-P and 3'-OH ends that can be labelled by the TUNEL reaction. ds, double stranded; ER, endoplasmic reticulum; HMW, high molecular weight; LMW, low molecular weight; ND, not determined; ss, single stranded; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-mediated nick end labelling.

Taula II. Classificació funcional de les endonucleases implicades en la fragmentació apoptòtica de l'ADN. (font: (Samejima and Earnshaw 2005)).

La taula II mostra una gran varietat d'endonucleases descrites dels dos tipus principals d'endonucleases establerts. Per altra banda, cal dir que aquestes endonucleases es poden classificar segons el requeriment dels ions bivalents necessaris per la realització de la seva activitat. Així, dintre dels dos tipus funcionals d'endonucleases, s'hi poden trobar nucleases independents de cations o àcides, nucleases depenents de ions Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, i nucleases depenents només de ions Mg<sup>2+</sup> (Samejima and Earnshaw 2005).

Entre la gran varietat d'endonucleases destaquen la DNasa II i I dintre de les DNAsas implicades en la degradació d'ADN exògen; i la L-DNasa II, DNasa- $\gamma$  i l'endonucleasa CAD en la categoria funcional de nucleases autònomes.

DNasa II actua com a una hidrolasa lisosomal àcida i independent de ions bivalents (Wang, Lu et al. 1998). El 20-30% de la proteïna es secreta al medi extracel·lular i, en un entorn àcidic, és capaç de fragmentar l'ADN exògen en trencaments tant de doble com de simple cadena donant lloc a extrems 3'-P (fosfats) (Barry and Eastman 1993; Barry, Reynolds et al. 1993). Per altra banda, aquesta DNasa és crucial per l'assoliment de la completa digestió de les restes cel·lulars i fragments apoptòtics fagocitats. Varis estudis mostren que la manca de la seva funcionalitat s'associa a cúmuls d'ADN cel·lulars que han estat fagocitats però no digerits (Mukae, Yokoyama et al. 2002; Kawane, Fukuyama et al. 2001; Krieser, MacLea et al. 2002).

DNAsa I és una altra endonucleasa rellevant en la degradació d'ADN exògen però depenent dels ions bivalents  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ . En concret, la seva correcta activació requereix de prèvies concentracions cel·lulars dels ions de l'ordre micromolar i és òptima a un pH de 7,5. La DNAsa I també es secreta a l'espai extracel·lular i pot realitzar trencaments de l'ADN tant de doble com simple cadena produint extrems 3'-OH lliures (Kreuder, Dieckhoff et al. 1984). No obstant, varis factors desfavoreixen la seva implicació en la degradació oligonucleosomal de l'ADN durant l'apoptosi. L'endonucleasa introdueix preferencialment trencaments en una de les cadenes de l'ADN cada 10 pb de forma recurrent, i únicament en presència de  $\text{Mn}^{2+}$ , és capaç d'establir trencaments de doble cadena (Lahm and Suck 1991). Alguns autors consideren, inclús, que aquesta DNAsa no té especificitat per unir-se a la regió internucleosomal i que en determinats models, malgrat detectar-se un increment de la seva activitat, no es transloca al nucli (Walker and Sikorska 1997; Torriglia, Negri et al. 1999).

L-DNAsa II com a endonucleasa autònoma presenta la particularitat que es pot inhibir amb acetat i conserva la meitat de la seva activitat a pH 7,4 malgrat l'òptim sigui 5,75 (Counis, Chaudun et al. 1998). Aquesta DNAsa deriva de la proteïna LEI (*leukocyte elastase inhibitor*) degut a una modificació post-traducciona acídica o a una digestió amb l'enzim elastasa (Torrighia, Perani et al. 1998). L-DNAsa II és capaç d'induir picnosi nuclear i degradació de la cromatina en nuclis aïllats. A més, la seva expressió s'incrementa durant l'apoptosi i es transloca des del citoplasma al nucli cel·lular (Belmokhtar, Torriglia et al. 2000; Torriglia, Perani et al. 1998). LEI és una proteïna amb activitat anti-proteasa que pertany a la família de les serpine (*serine protease inhibitors*). En la seva forma nativa és capaç d'inhibir proteases com l'elastasa, la cathepsina G i la proteïnasa 3 (Potempa, Dubin et al. 1988; Sugimori, Cooley et al. 1995). Després que LEI sigui modificada post-traduccionalment per una baixada del pH durant l'apoptosi, aquesta proteïna perd la seva activitat anti-proteasa i adquireix l'activitat endonucleàsica (Torrighia, Perani et al. 1998). Per altra banda, s'ha reportat que segons l'estímul apoptòtic, L-DNAsa II es pot activar de forma simultànea amb les caspases però en un procés de mort que resulta insensible als inhibidors de caspases (Altairac, Zeggai et al. 2003; Torriglia, Negri et al. 1999).

Una altra endonucleasa autònoma rellevant és la DNAsa- $\gamma$ , com a una endonucleasa depenent de cations bivalents i amb una elevada homologia a la DNAsa I. En concret, requereix de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , o bé,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  o únicament  $\text{Mn}^{2+}$  i es pot inhibir amb  $\text{Zn}^{2+}$  (Shiokawa, Ohyama et al. 1997). Per altra banda, s'ha vist que PARP-1 actua com a inhibidor d'aquesta endonucleasa, pel que el seu processament s'associa amb l'acció de la DNAsa- $\gamma$  (Boulares, Zoltoski et al. 2002). L'expressió cel·lular d'aquesta endonucleasa és selectiva. DNAsa- $\gamma$  és altament expressada en òrgans com la melsa, el fetge, el ronyó, els nòduls limfàtics i el timus, però és escassa per exemple al cervell, cor i pàncrees (Shiokawa, Ohyama et al. 1997; Shiokawa and Tanuma 1998). DNAsa- $\gamma$  s'emmagatzema al lúmen de l'envolta nuclear per ser alliberada al nucli en rebre l'estímul apoptòtic (Shiokawa, Shika et al. 2003; Shiokawa and Tanuma 2001). Els fragments d'ADN produïts per aquesta DNAsa poden contenir extrems 3'-OH/5' -P. A més, s'ha suggerit una implicació rellevant de la DNAsa- $\gamma$  com a endonucleasa principal en la degradació LMW de processos apoptòtics associats a diferenciació cel·lular, i a la hipermutació somàtica de gens de les immunoglobulines (Shiokawa, Kobayashi et al. 2002; Okamoto, Okamoto et al. 2005).

Pel que fa a CAD/DFF40/CPAN, aquesta és l'endonucleasa amb major implicació apoptòtica en la degradació oligonucleosomal de l'ADN (Enari, Sakahira et al. 1998; Halenbeck, MacDonald et al. 1998; Liu, Li et al. 1998; Liu, Zou et al. 1997). CAD requereix de la presència

del ió bivalent  $Mg^{2+}$  i té com a substrate preferent l'ADN de doble cadena, tot i que recentment també s'ha reportat la seva activitat en simple cadena (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guinon et al. 2012)

### 4.2.2. L'endonucleasa DFF40/CAD/CPAN

#### 4.2.2.A. Descobriment de CAD i el seu inhibidor DFF45/ICAD

L'endonucleasa CAD es va aïllar per primer cop, caracteritzar i clonar en cèl·lules tumorals humanes com al factor responsable de la degradació de l'ADN pel grup de X. Wang, el qual anomenà l'endonucleasa sota el terme de DFF (*ADN Fragmentation Factor*) (Liu, Zou et al. 1997). L'endonucleasa de 40 kDa es va aïllar juntament amb un altre polipèptid de 45 kDa en extractes citosòlics de cèl·lules Hela (cèl·lules derivades de carcinoma uterí humà) provinents d'assajos *cell free system*. En concret, la reacció *in vitro* d'aquests assajos va consistir en la combinació d'extractes citosòlics activats apoptòticament per l'addició de caspasa-3 recombinant amb nuclis intactes aïllats de cèl·lules en creixement. Liu i els seus col·laboradors, van ser capaços de determinar que únicament el polipèptid de 45 kDa es sotmetia a un processament per part de caspasa-3 que acabava generant un primer fragment intermediari de 24 kDa i un posterior d'11 kDa. La generació d'aquest últim es va correlacionar directament amb la fragmentació de l'ADN generada pel *cell free system* activat apoptòticament (Liu, Zou et al. 1997).

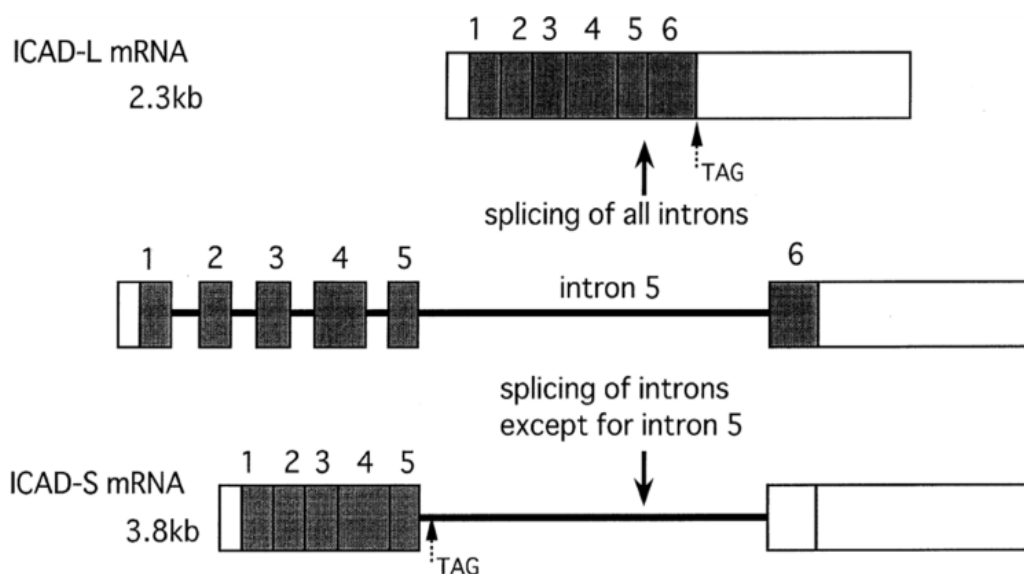
Halenbeck i els seus col·laboradors, també van contribuir en el descobriment de l'endonucleasa que demoninaren llavors com a CPAN (*caspase-activated nuclease*). CPAN per aquest grup es va aïllar en extractes citosòlics de cèl·lules Jurkat (limfòcits T humans immortalitzats) que en presència també de caspasa-3 recombinant, provocaven la fragmentació de l'ADN en assajos de tipus *in vitro* (Halenbeck, MacDonald et al. 1998). A més, Halenbeck i col·laboradors van seqüenciar CPAN i observaren que la proteïna era idèntica a la subunitat de 40 kDa descrita per Liu. Al mateix temps, però, un altre grup reafirmava la identificació de l'endonucleasa apoptòtica amb la seqüenciació de la CAD homòloga humana aïllada en ratolí (Mukae, Enari et al. 1998). Per altra banda, el grup de Halenbeck també demostrà que l'endonucleasa era menys activa en assajos realitzats en absència d'una proteïna *carrier* com BSA (*bovine serum albumin*) i de NaCl o bé, amb presència de  $Zn^{2+}$ . Al mateix temps, observaren que la seva activitat depenia dels ions bivalents  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  en menor mesura però no de  $Ca^{2+}$  (Widlak and Garrard 2001; Halenbeck, MacDonald et al. 1998). Aquests autors també consideraren que els baixos nivells de  $Mg^{2+}$  i/o NaCl eren la raó per la qual Liu i els seus col·laboradors no podien explicar la manca de l'activitat de la DNAsa en alguns dels seus experiments (Halenbeck, MacDonald et al. 1998).

CAD també es va reportar amb el grup de Nagata utilitzant igualment assajos *cell free system* però amb extractes citosòlics provinents d'un limfoma de cèl·lules T de ratolí (Enari, Sakahira et al. 1998). La denominació en aquest cas per l'endonucleasa i al seu inhibidor, van ser de CAD (*caspase-activated DNAsa*) i ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNAsa*). CAD de ratolí resultà ser la homòloga humana amb una identitat del 75,6% (Mukae, Enari et al. 1998). El grup de Nagata, a més, determinà que l'endonucleasa era una proteïna bàsica mentre que ICAD es caracteritzava per ser una proteïna àcida amb uns punts isoelèctrics (PI) de 9,7 i 4,5 respectivament en cada un dels casos (Enari, Sakahira et al. 1998). A més a més, el grup de Nagata establí que la forma inactiva de CAD en cèl·lules en creixement semblava existir com a un complex de l'endonucleasa amb ICAD on aquesta actuava com a principal inhibidor de la fragmentació de l'ADN (Sabol, Li et al. 1998). En aquest sentit, Halenbeck i col·laboradors també aportaren que l'expressió funcional de CPAN *in vitro* només succeïa en presència d'ICAD. D'aquesta manera,



s'atribuïa una nova funció de xaperona a ICAD, donat que aquesta es relacionà amb el correcte plegament de CAD (Halenbeck, MacDonald et al. 1998). A més a més, els ensajos *cell free system* de Halenbeck també mostraven que l'addició de DFF45/ICAD a extractes citosòlics de cèl·lules Jurkat pre-activats amb caspasa-3 eren capaços d'inhibir la degradació de l'ADN.

Per altra banda, Enari i els seus col·laboradors aïllaren dues isoformes d'ICAD que denominaren com a ICAD-L i ICAD-S. La diferència de les dues variants es va detectar a nivell de *splicing* alternatiu en el processament dels respectius RNA missatgers (Enari, Sakahira et al. 1998). El missatger d'ICAD-L contenia els 6 exons codificants de la proteïna mentre que ICAD-S li mancava l'últim exó degut a la no prèvia eliminació de l'intró 5 (Figura I42). Treballs posteriors de mutagènesi dirigida en les dues isoformes d'ICAD, rebelaren els residus d'àcid aspàrtic (Asp117 i Asp224) en els quals caspasa-3 realitza el processament proteolític de les dues isoformes (Sakahira, Enari et al. 1998). En aquests experiments també, s'observà que la manca d'un correcte processament d'ICAD podia evitar l'activació de l'endonucleasa (Sakahira, Enari et al. 1998). De fet, es detectà que el processament d'ICAD en el residu del segon tall proteolític per part de caspasa-3 (Asp224) era menys eficient quan la proteïna es mutava en el primer tall proteolític (Asp117). En aquest sentit, la diferència d'efectivitat de processament del substrate acabava suggerint que el segon tall proteolític s'afavoria per la prèvia eliminació de la part N-terminal d'ICAD (Wohrl and Hacker 1999).



**Figura I42. Generació de les dues isoformes d'ICAD: ICAD-L i ICAD-S.** El precursor de RNAm per l'expressió de les dues isoformes (al mig) es processa per *splicing* alternatiu donant lloc al respectiu precursor de la isoforma de ICAD-L (a dalt) i al de la ICAD-S (a baix). El precursor de la ICAD-L conté els 6 exons (regions codificants indicades en quadrats grisos numerats) per l'eliminació de tots els respectius introns (regions no codificants mostrades com a regions lineals ubicades entre els diferents exons). En el cas però del precursor de ICAD-S, l'intró 5 no es processa pel que és deficient en l'últim exó. Les fletxes puntejades indiquen les posicions del primer codó de terminació (adaptat de (Kawane, Fukuyama et al. 1999)).

ICAD és doncs, per excel·lència l'inhibidor endògen fins ara reportat de CAD. No obstant, s'ha descrit també la funció inhibidora de l'endonucleasa per part del compost químic antitumoral curcumina. Aquest agent pot induir una mort apoptòtica amb activació de caspases i condensació de la cromatina, però és incapaç d'estimular la fragmentació internucleosomal de l'ADN (Sikora, Bielak-Zmijewska et al. 2006).

En qualsevol cas, la funció apoptòtica de la fragmentació internucleosomal de l'ADN s'associà definitivament a l'endonucleasa CAD/DFF40/CPAN amb el treball de Mukae i

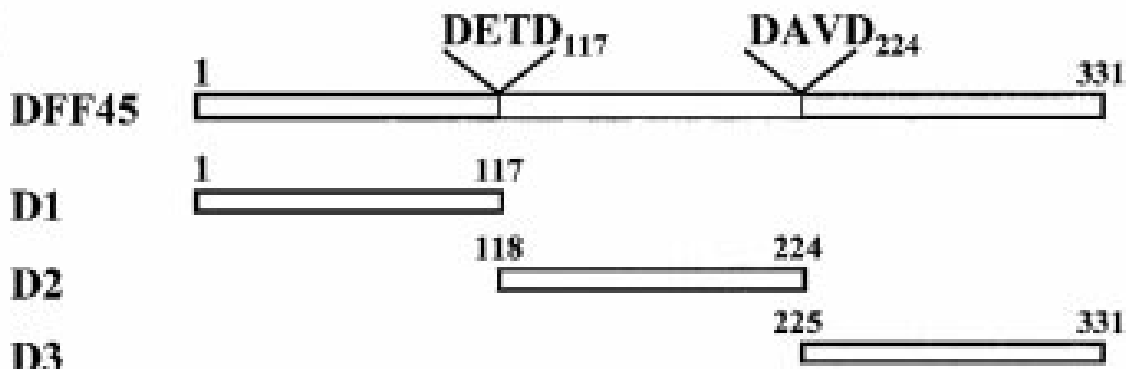
col·laboradors. En aquest treball, es va correlacionar de forma directa els nivells d'expressió de CAD en diferents tipus cel·lulars amb la fragmentació apoptòtica de l'ADN (Mukae, Enari et al. 1998). Per altra banda, la generació del ratolí *knockout* de CAD i el del seu inhibidor ICAD, tots dos viables però deficientes en la inducció dels *hallmarks* apoptòtics, també van contribuir a considerar CAD com al factor responsable de la fragmentació apoptòtica de l'ADN (Kawane, Fukuyama et al. 2003; Zhang, Liu et al. 1998).

#### 4.2.2.B. Requeriments bioquímics i estructurals per l'activitat de CAD

Entre els requeriments bioquímics necessaris per l'activitat de CAD destaquen la presència dels ions bivalents  $Mg^{2+}$  i l'absència de  $Ca^{2+}$  (Widlak and Garrard 2001). Per altra banda, l'activitat de CAD es pot inhibir per  $Cu^{2+}$  i afavorir amb concentracions de  $K^{+}$  d'entre 50 i 125 mM (Widlak and Garrard 2001). A més, CAD posseeix una alta activitat en un ampli rang de pH de 7,0 a 8,5 (Widlak and Garrard 2001; Widlak, Li et al. 2000). No obstant, CAD és capaç de formar, en presència d'ICAD, un complex estable amb l'ADN de forma independent a la presència del ió  $Mg^{2+}$ . De fet, la pròpia unió del complex CAD-ADN ja estimula la posterior activitat de l'endonucleasa amb l'ensamblatge de l'homodímer al voltant de l'ADN. D'aquesta manera, es facilita l'accés del substracte al centre catalític de la nucleasa (Korn, Scholz et al. 2005).

CAD té preferència per l'ADN de doble cadena amb capacitat també d'hidrolitzar l'ADN de simple cadena. No obstant, l'endonucleasa no disposa d'una especificitat de seqüència, tot i que adopta major preferència per les regions amb un parell d'eixos de simetria (Widlak, Li et al. 2000). Cal afegir, que també s'ha descrit que l'endonucleasa pot degradar ADN plasmídic però a diferència dels nuclis aïllats, es requereixen majors concentracions de l'enzim (Liu, Li et al. 1998).

Per altra banda, també es va reportar la existència de diverses proteïnes nuclears que poden afavorir l'acció de fragmentació apoptòtica de l'ADN de CAD. La presència de proteïnes associades a la cromatina com HMG-1 i -2 (*high mobility group*), histona H1 i topoisomerasa II, és capaç d'estimular l'activitat de la DNAsa (Liu, Li et al. 1998; Toh, Wang et al. 1998; Widlak, Li et al. 2000). D'alguna manera doncs, el tall de CAD en la cromatina ha de ser dirigit en la regió internucleosomal per afavorir l'accés de l'endonucleasa en aquestes regions.



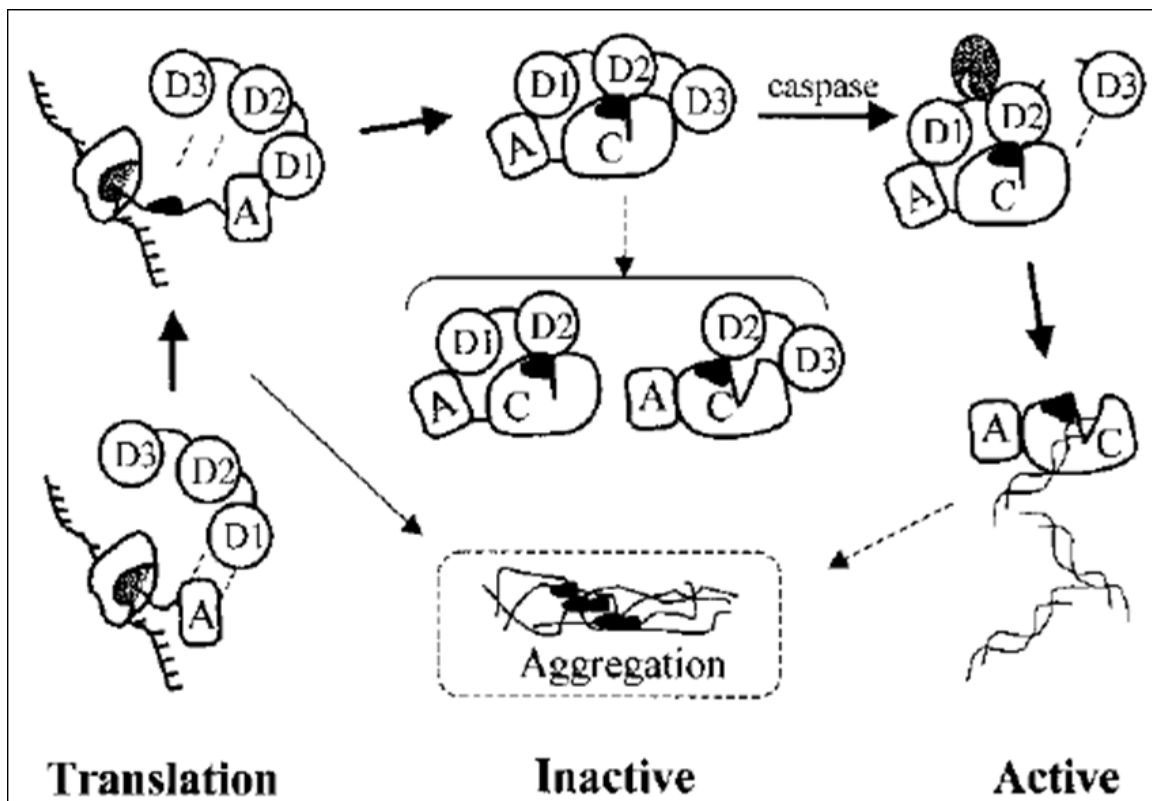
**Figura 143. Formes truncades de la proteïna DFF45/ICAD.** Diferents formes d'ICAD generades a partir de totes les combinacions possibles de mutació en els residus de tall proteolític de caspasa-3 (DETD117 i DAVD224). S'obtenen tres proteïnes ICAD amb cada un dels tres dominis de forma individual (D1, D2 i D3), més dues altres possibles proteïnes amb la combinació dels dominis D1-D2 i D2-D3 (modificat de (McCarty, Toh et al. 1999)).

Estructuralment, CAD consta principalment d'un domini catalític en la part C-terminal i un domini regulador en la part N-terminal. La deleció del domini catalític implica una CAD inactiva però que pot estar unida al seu inhibidor. La deleció en canvi de l'altre domini, genera una nucleasa constitutivament activa encara que amb menor grau que la *wild type*. Per contra, aquesta forma mutada de CAD no es pot unir amb ICAD i no requereix, per tant, de l'activació de caspasa-3 (Inohara, Koseki et al. 1999).

De fet, l'òptima interacció entre ICAD i CAD és determinant pel correcte plegament de l'endonucleasa i el conseqüent manteniment del seu estat soluble i funcional. Dels tres dominis generats d'ICAD originats pel processament de caspasa-3 (D1 com a regió N-terminal, D2 com a intermèdia i D3 com a regió C-terminal), s'ha reportat que el domini D1 és crucial com a xaperona en la síntesi *de novo* de CAD (McCarty, Toh et al. 1999) (Figura I43). A més a més, les formes truncades d'ICAD amb processament parcial dels seus dominis (D1+D2 i D2+D3) poden també unir-se a CAD amb alta afinitat i contribuir en el manteniment del seu estat soluble (McCarty, Toh et al. 1999; McCarty, Toh et al. 1999) (Figura I44).

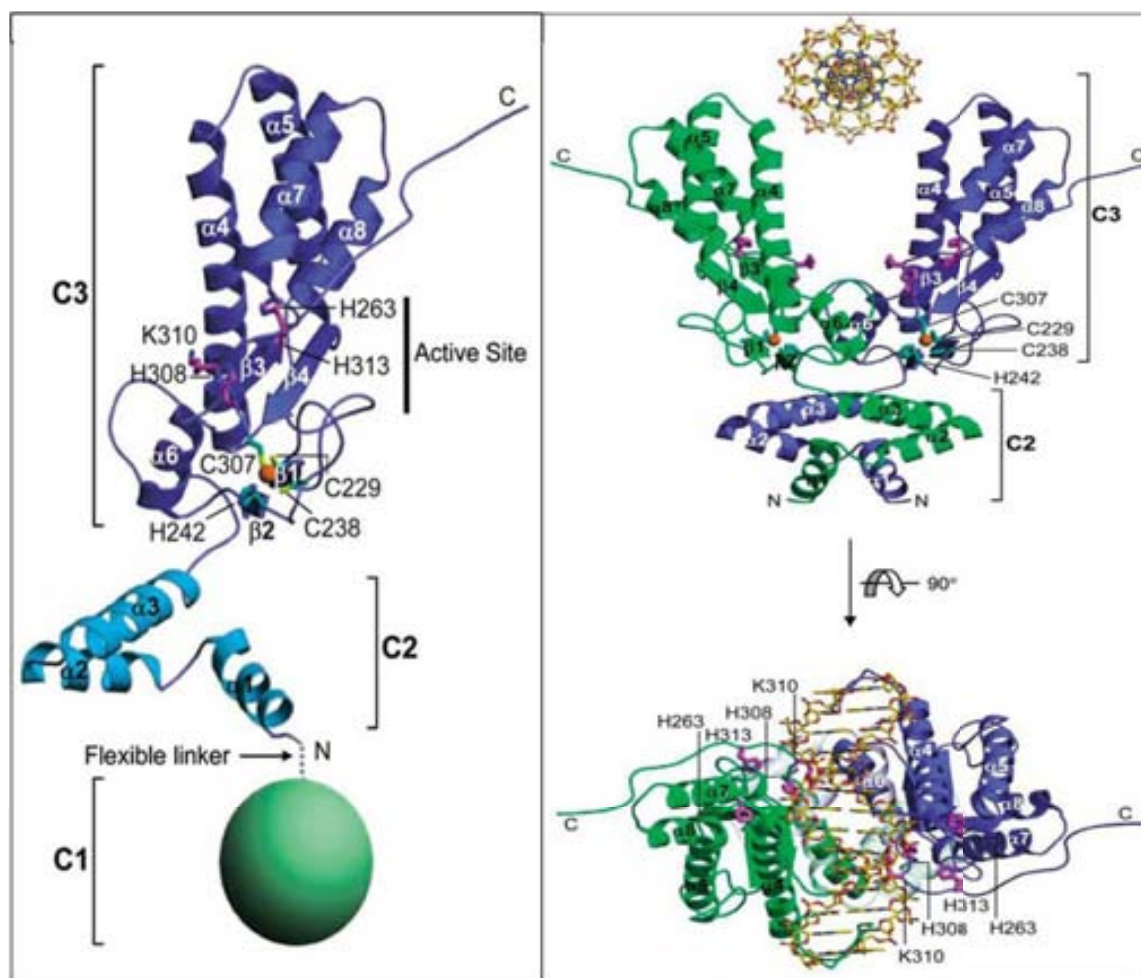
El domini N-terminal regulador de CAD sembla ser la única regió homòloga amb la part també N-terminal d'ICAD. Aquestes regions es caracteritzen per presentar l'anomenat domini CIDE-N (*cell death inducing DFF45-like effector-N-terminal*) (Lugovskoy, Zhou et al. 1999). De forma més concreta, en mamífers s'han descrit tres gens codificants per proteïnes relacionades estructuralment amb ICAD denominades CIDE-A, CIDE-B i CIDE-C/CIDE-3 constituïdes pel domini CIDE-N, com a domini regulador i el domini CIDE-C, com a domini requerit per la execució de l'apoptosi (Liang, Zhao et al. 2003). De forma interessant, s'ha demostrat que l'expressió de CIDE-A o CIDE-B és capaç d'induir la fragmentació apoptòtica de l'ADN i que aquest efecte funcional s'inhibeix per ICAD a través de la seva interacció pels dominis CIDE-N de les diferents proteïnes (Inohara, Koseki et al. 1998). El mateix tipus d'interacció amb ICAD es reporta amb CAD a nivell dels dominis CIDE-N. A més, s'ha establert que el domini N-terminal de CAD pot induir el plegament *de novo* del domini N-terminal d'ICAD (Zhou, Lugovskoy et al. 2001). El complex resultant d'aquesta interacció es caracteritza per una combinació d'interaccions hidrofíliques i hidrofòbiques amb una disposició estructural convexa de CAD i còncava d'ICAD de les seves superfícies d'interacció (Zhou, Lugovskoy et al. 2001).

En qualsevol cas, l'estructura de la molècula de CAD com a monòmer es constitueix pel domini N-terminal o domini C1 (domini CIDE-N), el qual és determinant en la interacció del seu inhibidor; un domini més petit reponsable de la homodimerització de la molècula, anomenat domini C2; i el domini C-terminal com al domini catalític o altrament anomenat domini C3. C2 es constitueix per tres hèlixs  $\alpha$ , mentre que el domini C3 de major tamany el formen també varies hèlixs  $\alpha$  amb 4 cadenes  $\beta$  i un *loop* llarg C-terminal (Figura I44). C3 conté el centre actiu de CAD caracteritzat per tenir residus d'histidina altament conservats (His242, His263, His308 i His313) essencials pel manteniment de la funció de la nucleasa (Meiss, Scholz et al. 2001; Sakahira, Takemura et al. 2001).



**Figura I44. Mecanisme d'acció de DFF45/ICAD com a xaperona i inhibidora de l'activitat de DFF40/CAD.** La proteïna ICAD (amb els dominis D1, D2 i D3) interacciona amb CAD durant la seva traducció als ribosomes. El domini D1 d'ICAD s'uneix de forma exclusiva i ràpida al domini soluble A de CAD que conté els 80 primers residus aminoacídics. Aquesta primera unió és crítica per l'expressió soluble de l'endonucleasa. Expressada de forma completa la proteïna CAD (amb el domini N-terminal regulador indicat com a A i el domini C-terminal catalític referit com a C), la inhibició de l'endonucleasa es realitza pel manteniment de la seva interacció amb ICAD a nivell de D1 i D2, o bé D2 i D3 sent D2 determinant en el bloqueig del domini catalític. El tall proteolític de les caspases en ICAD porta a la dissociació del complex per la conseqüent alliberació i activació de l'endonucleasa. Els dominis D1 i A corresponen als dominis CIDE (adaptat de (McCarty, Toh et al. 1999)).

La forma activa de CAD, però, acaba sent un homodímer on els dominis C3 dels monòmers donen lloc a una estructura de tisora oberta en la qual les fulles d'aquesta tisora defineixen una zona àmplia i profunda per l'ADN a fragmentar (Figura I45). D'aquesta manera, l'ADN de doble cadena pot acomodar-se de forma favorable en aquesta zona per tal de tenir accés i arribar als residus d'histidina rellevants per l'activitat catalítica de CAD (Woo, Kim et al. 2004). Per altra banda, existeixen residus aminoacídics essencials per la unió de l'endonucleasa al solc major de l'ADN situats dins i al voltant de la hèlix- $\alpha$  4 de CAD, que s'estableixen a partir de l'aminoàcid 156 (Reh, Korn et al. 2005). Tot i així, s'ha descrit que una simple substitució del residu ja en la posició 155 de lisina per un de glicina, no permet la unió de CAD a l'ADN (Korn, Scholz et al. 2005).



**Figura 14.5.** Estructura monomèrica i dimèrica de DFF 40/CAD. A l'esquerra, estructura monomèrica de l'endonucleasa CAD amb C1 com a domini N-terminal (CIDE-N), C2 com a domini de dimerització i C3 com a domini catalític. El domini C1 no es mostra (s'indica en forma d'esfera) i el domini C3 s'indica amb el seu centre actiu i els residus d'histidina i lisina rellevants per l'activitat catalítica de CAD. A la dreta a la part superior, l'estructura homodimèrica de CAD en forma de tisora oberta i a la part inferior, la mateixa estructura interaccionant amb 14 parells de base d'ADN modelat. La interacció es mostra de forma específica a nivell de la hèlix- $\alpha$  4 del domini C3 de CAD amb el solc major de l'ADN (adaptat de (Woo, Kim et al. 2004)).

#### 4.2.2.C. Localització cel·lular i estat d'oligomerització del complex ICAD-CAD

La idea original sobre la localització del complex ICAD-CAD estipula que ICAD manté segregada l'endonucleasa al citoplasma de cèl·lules en creixement i que en condicions apoptòtiques, després del procesament caspàsic d'ICAD, CAD es transloca al nucli per exercir la seva funció de fragmentació de l'ADN apoptòtica (Enari, Sakahira et al. 1998). A més, experiments de subfraccionament realitzats en diferents tipus de cèl·lules tumorals humans rebel·len que la localització de les dues isoformes d'ICAD era exclusivament citosòlica (Sabol, Li et al. 1998). No obstant, en paral·lel sorgiren diferents treballs amb proteïnes de fusió (com GFP-ICAD i i GFP-CAD) en els que es demostrava una localització nuclear de les dues proteïnes en cèl·lules en creixement provinents de porc, polastre i humà (Samejima and Earnshaw 1998; Samejima and Earnshaw 2000). Al seu torn, aquests resultats es correlacionaven amb dades obtingudes d'estudis de subfraccionaments cel·lulars on també s'havia observat una localització nuclear tant de CAD com del seu inhibidor (Chen, Stetler et al. 2000; Samejima and Earnshaw 1998). En un primer moment, però, l'anàlisi de la seqüència d'ICAD de llavors no revelà cap seqüència de localització

nuclear. Es va postular, inclús, sobre la possibilitat que ICAD es transportés al nucli constituint un complexe amb una altra molècula portadora de la seqüència de localització nuclear (Samejima and Earnshaw 1998). Posteriorment, el treball de Samejima i Earnshaw identificà una seqüència rica d'aminoàcids bàsics en la part C-terminal d'ICAD-L que podia funcionar com a una seqüència de localització nuclear autònoma. En concret, s'observà una localització específica nuclear de GFP-ICAD-L, mentre que ICAD-S es localitzava de forma difusa en tota la cèl·lula (Samejima and Earnshaw 2000). Aquesta localització descrita per les dues isoformes d'ICAD també s'havia observat pels complexos ICAD-L·CAD i ICAD-S·CAD (Scholz, Korn et al. 2002). Per altra banda i de forma més específica, també es va reportar sobre la presència del complexe ICAD-S·CAD en la fracció nuclear, mentre que la isoforma ICAD-S per si sola sense acomplexar-se amb l'endonucleasa, es localitzava únicament al citosol (Chen, Stetler et al. 2000). Altres autors, però, mostren que el complexe ICAD·CAD es localitza en les fraccions citosòlica, microsomal i nuclear (Nagata, Kishi et al. 2002).

Treballs més posteriors, però, sostenen la idea que la translocació nuclear del complexe ICAD·CAD es regula a través d'una importina  $\alpha/\beta$  mitjançant una interacció amb les regions C-terminal de les dues proteïnes del complexe (Neimanis, Albig et al. 2007). Els mateixos autors indiquen també, que una regió rica en aminoàcids bàsics de la regió C-terminal de cada subunitat (RLKRK en DFF40 i KRAR en DFF45) és essencial per l'acumulació nuclear del complexe. De fet, es postula sobre la idea que la translocació de DFF cap al nucli consisteix en un reconeixement simultani d'aquestes regions C-terminal de les dues proteïnes per part de la importina  $\alpha$  (Neimanis, Albig et al. 2007).

Pel que fa a l'estat d'oligomerització dels diferents components del complexe ICAD-CAD, es creu que la major part de les cadenes DFF45/ICAD s'associen entre elles mateixes o amb altres cadenes polipeptídiques per constituir trímers o tetràmers (Sabol, Li et al. 1998). A més, s'ha observat que els complexos DFF40·DFF45 es troben en forma d'heterodímers i que després de la seva activació per part de caspasa-3, DFF40 forma part de macrocomplexos (Liu, Zou et al. 1999). A més a més, també s'ha reportat la presència de monòmers lliures de DFF45/ICAD-L i DFF35/ICAD-S *in vivo* detectats en excés respecte a DFF40/CAD (Lechardeur, Dougaparsad et al. 2005; Widlak, Lanuszewska et al. 2003). L'expressió dels diferents inhibidors sembla no trobar-se regulada de forma estequiomètrica d'acord al número de molècules de DFF40/CAD sintetitzades (Widlak, Lanuszewska et al. 2003). De fet, s'ha establert que de forma concreta els monòmers lliures de DFF45/ICAD-L poden inclús arribar a associar-se amb homo-oligòmers de DFF40/CAD prèviament activada bloquejant de nou la seva activitat (Widlak, Lanuszewska et al. 2003).

Altres treballs sustenten la idea que el complexe ICAD·CAD en la seva forma inactiva conté dues molècules de DFF45/ICAD-L i dues de DFF40/CAD. Amb el complexe activat, es pensa que aquest està compost igualment per dues molècules de CAD o com a màxim quatre. En aquest model de complexe, s'han postulat dues vies alternatives d'activació de DFF40/CAD (Lechardeur, Dougaparsad et al. 2005). D'una banda, l'alliberament d'una sola molècula de DFF40/CAD de l'heterotetràmer DFF (CAD2/ICAD2) podria promoure la seva associació amb una altra molècula monomèrica de DFF40/CAD per constituir la nucleasa activa (CAD2). O alternativament, també s'ha postulat sobre la possibilitat que un cop processada DFF45/ICAD-L, DFF40/CAD es constitueix en forma de trímer (CAD2/ICAD). Seguidament, el tall de la segona molècula de DFF45/ICAD-L permetria que la DFF40/CAD dimèrica formés el dímer actiu. Tots dos models, però, estableixen que l'activació de l'endonucleasa requereix la proteòlisi de suficient

quantitat de DFF45/ICAD-L per permetre la dimerització de DFF40/CAD (Lechardeur, Dougaparsad et al. 2005).

#### 4.2.2.D. Expressió i funció de les isoformes d'ICAD: ICAD-S i ICAD-L

L'expressió de les dues isoformes d'ICAD es reporta en un ampli rang de línees cel·lulars humanes, sent ICAD-L la forma predominant en els citosols de la major part de les cèl·lules analitzades (Sabol, Li et al. 1998). No obstant, altres treballs apunten a l'expressió diferencial de les isoformes en sentit contrari. DFF35/ICAD-S s'expressa en major grau, per exemple, en glioblastomes però en menor grau en meduloblastomes, sent aquesta la darrera tendència en els tipus cel·lulars neuronals (Masuoka, Shiraishi et al. 2001). Els nivells d'expressió en ratolí, però, difereixen bastant dels analitzats en tipus cel·lulars humans. Mentre DFF45/ICAD-L és més abundant per exemple en teixits com la melsa i timus correlacionat al seu torn amb uns bons nivells de DFF40/CAD, DFF35/ICAD-S és més abundant que DFF45/ICAD-L en cèl·lules MEF correlacionant-se a la vegada, amb una baixa expressió de DFF40/CAD (Nagase, Fukuyama et al. 2003).

Funcionalment, ICAD-L es va associar des del principi com a inhibidor de DFF40/CAD i proteïna xaperona de l'endonucleasa crucial pel seu correcte plegament i expressió funcional. DFF35/ICAD-S, en canvi, s'apunta com a molt en alguns treballs amb una acció inhibidòria sobre l'activitat de l'endonucleasa tant *in vivo* com *in vitro* (Gu, Dong et al. 1999; Sakahira, Enari et al. 1999). Per altra banda, cal dir que s'han identificat les regions peptídiques requerides per interaccionar i realitzar l'acció inhibidòria de CAD en les dues isoformes d'ICAD (Gu, Dong et al. 1999). Respecte a la possible funció de xaperona per part de DFF35/ICAD-S, s'ha reportat en alguns models cel·lulars on ICAD-S és la isoforma predominantment expressada, que aquesta pot estimular la fragmentació apoptòtica de l'ADN després del seu processament. Entre aquests models es troben diferents teixits de rata i ratolí. Aquestes dades acaben suggerint la possible actuació de DFF35/ICAD-S com a xaperona de DFF40/CAD (Chen, Stetler et al. 2000).

Per altra banda, els ratolins *knockout* d'ICAD són incapaços d'expressar CAD pel que es reafirma la rellevància funcional d'ICAD com a xaperona de l'endonucleasa (Zhang, Liu et al. 1998). A més, també s'ha vist que la restitució de la isoforma ICAD-L però no de la ICAD-S en MEF derivades d'aquests ratolins, permet expressar de forma endògena la CAD completament funcional (Nagase, Fukuyama et al. 2003). Cal afegir, que el domini específic implicat en la funció xaperona d'ICAD-L s'estableix com al domini D1 però que en el cas d'ICAD-S, varis treballs apunten a considerar que aquesta isoforma no realitza aquesta funció malgrat tingui el mateix domini D1 (Gu, Dong et al. 1999; Sakahira, Enari et al. 1999). De fet, la incapacitat de DFF35/ICAD-S d'actuar com a xaperona de DFF40/CAD es recolza per la seva detecció *in vivo* en una forma principalment lliure i no unida a l'endonucleasa (Sakahira, Enari et al. 1999). Una possible explicació d'aquest comportament diferencial pot ser que la manca dels 70 aminoàcids de la regió C-terminal de DFF35/ICAD-S, presents en canvi en DFF45/ICAD-L, siguin determinants en l'execució de la funció xaperona (McCarty, Toh et al. 1999; Scholz, Korn et al. 2002).

Una altra dada rellevant reportada sobre la funció xaperona de ICAD-L és la contribució del sistema xaperona Hsc70 (l'homòleg de Hsp70 expressat constitutivament) – Hsp40 en el plegament de DFF40/CAD (Sakahira and Nagata 2002). DFF45/ICAD-L es troba igualment unida des del principi en la cadena polipeptídica inicial de DFF40/CAD sintetitzada als ribosomes. No obstant, el sistema xaperona Hsc70-Hsp40 contribueix en el plegament de l'endonucleasa a nivell de la regió C-terminal de DFF40/CAD en fase d'elongació. D'aquesta manera, DFF45/ICAD-L

unida al domini CIDE-N de DFF40/CAD és capaç de reconèixer la part C-terminal parcialment plegada de l'endonucleasa promovent el seu correcte plegament i el posterior alliberament del complex ICAD-L·CAD dels ribosomes (Sakahira and Nagata 2002).

Per altra banda, l'acció inhibidora de DFF40/CAD per part d'ICAD es descriu com a específica, donat que ICAD no és capaç d'inhibir altres activitats DNAsas com la I i la II (Halenbeck, MacDonald et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998).



## **IV. HIPÒTESI I OBJECTIUS**





Les cèl·lules derivades de neuroblastoma humà SH-SY5Y s'han descrit com a un model cel·lular capaç de presentar un fenotip de mort completament apoptòtic després de ser sotmeses a un estímul intrínsec de mort com, per exemple, l'estaurosporina (Yuste, Bayascas et al. 2001; Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005). No obstant, altres línies cel·lulars, també derivades de neuroblastoma humà, pateixen una mort cel·lular depenent de l'activació de les caspases però són defectives de forma completa o parcial en manifestar els dos *hallmarks* de la mort apoptòtica, com la morfologia nuclear apoptòtica i la fragmentació oligonucleosomal del DNA, després del tractament amb aquest estímul apoptòtic (Boix, Llecha et al. 1997; Iglesias-Guimaraes, Gil-Guinon et al. 2012). En aquest sentit, ens vam plantejar la cerca i anàlisi d'un tipus de mort no apoptòtica dins el propi model cel·lular de les SH-SY5Y, com a una estratègia per estudiar nous processos de mort cel·lular. L'estudi de vies de mort diferents a l'apoptosi canònica resulta, però, encara més rellevant com a possible alternativa antitumoral quan la quimioteràpia actual resulta inefectiva. És per això, que es va trobar interessant conèixer si les cèl·lules SH-SY5Y podien patir un procés de mort no apoptòtica i, en cas afirmatiu, estudiar els mecanismes moleculars i bioquímics implicats. Així, després de ser sotmeses a una àmplia varietat d'estímuls intrínsecs de mort, l'anàlisi de la morfologia nuclear, juntament amb els assajos de viabilitat cel·lular, ens va permetre constatar un tipus de mort diferent de l'apoptòtica després del tractament amb l'alcaloide queleritrina. A partir d'aquí, es van establir diversos objectius més específics associats a l'estudi d'aquest tipus de mort:

- 1- Caracterització de la mort cel·lular en absència dels dos *hallmarks* apoptòtics després del tractament amb queleritrina.
- 2- Anàlisi i implicació de les caspases en la mort cel·lular induïda per queleritrina.
- 3- Comparació de la mort cel·lular induïda per queleritrina amb altres agents citotòxics amb propietats semblants a l'alcaloide (BH3 mimètics i agents intercalants).
- 4- Estudi del sistema ICAD·CAD en la mort induïda per queleritrina.
- 5- Cerca de possibles inhibidors de la mort cel·lular desencadenada per queleritrina.



## **V. MATERIALS I MÈTODES**





## 1. Cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà SH-SY5Y, SKN-AS, SK-N-SH, IMR-5, IMR-32, LAN-1, SK-NBE(2) and SK-N-JD es van mantenir en cultiu de forma rutinària en plaques de 100 mm (Falcon Discovery Labware, BD Biosciences) amb medi *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS de *fetal bovine serum*, Invitrogen), 20 unitats/ml de penicil·lina i 20 µg d'estreptomicina (Invitrogen). El medi d'aquestes cèl·lules es considerà com a medi complet i es canvià cada tres dies. Les cèl·lules es van mantenir a 37 °C en una atmosfera d'humitat saturada contenint 95% d'aire i 5% de CO<sub>2</sub>. De forma rutinària, les cèl·lules es van rentar amb PBS (Invitrogen) i deshaderir de les plaques amb tripsina i EDTA al 0,25% (Invitrogen) durant 1 minut a 37 °C. A continuació, s'inactivà la tripsina afegint medi complet i es recolliren les cèl·lules per centrifugar-se a 200 xg durant 5 min. El pèl·let cel·lular es ressuspendué amb medi complet i s'addicionà 1/3 de les cèl·lules a la placa de 100 mm. De forma específica, totes les línies de neuroblastoma excepte les SKN-AS, SK-N-SH i LAN-1, es van aixecar de les plaques amb tripsina diluïda 1/5 amb PBS.

## 2. Transfecció cel·lular

La construcció plasmídica pcADN3-hICAD-L-Flag amb el respectiu control de transfecció del plàsmid buit (pcADN3), es va utilitzar per ser transfectada en les cèl·lules SH-SY5Y utilitzant el reactiu del lípid catiònic lipofectamina (*Lipofectamine 2000 transfection reagent*, Invitrogen). La construcció plasmídica emprada com a plàsmid d'expressió de la isoforma llarga d'ICAD (ICAD-L) humana deriva del laboratori (Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005).

Un dia abans de la transfecció les cèl·lules es van sembrar a una confluència del 70 % en plaques de 35 mm amb medi complet. Al dia següent, es realitzà la transfecció utilitzant 250 µl de medi amb 10 µl de lipofectamina i 4 µg del corresponent ADN plasmídic diluït en també 250 µl de medi sense sèrum ni antibiòtic. Després de deixar atemperar la dilució amb la lipofectamina durant 5 minuts, es mesclaren les dues barreges suaument i es deixà reposar la mescla resultant 20 minuts més a temperatura ambient. Posteriorment, es va afegir 1 ml de medi sense sèrum ni antibiòtic al tub de la barreja. S'aspirà el medi de les plaques a transfectar i s'addicionà suaument i a poc a poc pel lateral de les plaques la barreja plasmídica. Sis hores després, es canvià el medi de transfecció per medi complet. En arribar al 100% de confluència, les cèl·lules es van ressemmar en plaques de 60 mm amb medi complet i dos dies després es va procedir a la selecció de les cèl·lules afegint 0,5 mg/mL de geneticina al medi de cultiu. En paral·lel, es van sembrar cèl·lules wt sense transfectar a la mateixa concentració de geneticina com a control negatiu de selecció. La mort de totes les cèl·lules wt per geneticina indicà la fi del període de selecció i la retirada de l'antibiòtic en les cèl·lules transfectades.

## 3. Assajos de viabilitat cel·lular

### 3.1. Assaig de supervivència: MTT

El compost MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) és una sal de tetrazolium de color groc, soluble en aigua. L'assaig de supervivència es basa en l'avaluació de la capacitat de les cèl·lules per reduir aquest compost, donant lloc a una sal de formazan insoluble en aigua i de color blau. El compost MTT és únicament reduït per aquelles cèl·lules metabòlicament viables que disposen de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa actiu.

Després de la reducció del MTT, la sal de formazan produïda es solubilitza amb dimetilsulfòxid (DMSO). La quantitat de sal formazan generada és proporcional al número de cèl·lules viables.

L'assaig es va duu a terme en plaques de 96 pous utilitzant el compost MTT (Sigma) diluït a 5 mg/ml amb DMEM (Invitrogen) sense sèrum. El compost es va afegir als pous de les cèl·lules a una concentració final de 0,5 mg/ml i es deixà incubar durant almenys 30 minuts en les condicions habituals de manteniment de les cèl·lules. Passat aquest temps, s'observà en camp clar al microscopi la formació dels cristalls de formazan en les diferents cèl·lules viables i es procedí a aspirar amb molta cura el medi de tots els pous. Posteriorment, amb la màxima precisió possible s'afegiren a cada un dels pous 100 µl d'una solució de DMSO amb una concentració del 0,05% d'un detergent com Tritó X-100 (Sigma) o NP-40 (Igepal Ca-630, Sigma). La dissolució dels cristalls de formazan va permetre fer una lectura dels valors d'absorbància adquirits en les diferents condicions. La lectura es va realitzar a través del lector de plaques BIO-TEK Power Wave XS a 590 nm i 620 nm. Els valors finals de viabilitat cel·lular es van obtenir de la resta de la lectura de 620 nm a la de 590 nm i es van normalitzar respecte a l'absorbància del control cel·lular no tractat.

### **3.2. Assajos de mort cel·lular: alliberament de LDH extracel·lular i doble tinció nuclear de PI i Hoechst 33342**

La mort cel·lular es va determinar mitjançant els assajos d'alliberament extracel·lular de l'enzim citosòlic lactat deshidrogenasa (LDH) i la doble tinció nuclear amb l'agent intercalant iodur de propidi (PI) i la bisbenzamida de Hoechst número 33342 (Hoechst permeable). Aquests assajos es van realitzar en plaques de 96 pous.

La citotoxicitat cel·lular mesurada per l'assaig LDH va permetre avaluar les cèl·lules mortes que posseïen una membrana plasmàtica desintegrada i que, en conseqüència, estaven alliberant la LDH al medi extracel·lular. La determinació de la LDH es realitzà acoblant una reacció colorimètrica a la reacció de l'enzim per poder-ne fer la posterior quantificació a través de la lectura d'absorbància. Per la realització de l'assaig, s'utilitzaren diversos components tals com el substrate lactat (Sigma) i el cofactor NAD<sup>+</sup> (Sigma) que en presència de LDH generaren NADH i àcid pirúvic. La reacció colorimètrica s'acoblà addicionant l'enzim diaforasa (Sigma) i el substrate INT (*iodonitroretrozolium*, Sigma). Aquests components en presència de NADH generaren el producte colorimètric de formazan. La quantificació de la LDH es dugué a terme de forma indirecta a través de la lectura de l'absorbància d'aquest últim producte. Els valors de les absorbàncies es van adquirir al lector de plaques BIO-TEK Power Wave XS a 490 nm. La normalització dels valors de mort cel·lular es realitzà respecte a un control positiu de mortalitat induït per una llisi cel·lular en un control sense tractar com a condició màxima d'alliberament extracel·lular de LDH. La inducció de la llisi cel·lular en el control de màxima mortalitat es realitzà sempre abans d'iniciar l'assaig a través de l'addició de Tritó X-100 a una concentració final de l'1% i deixant actuar el detergent durant 5 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es procedí a iniciar l'assaig en la placa de 96 pous addicionant primerament 20 µl/pou de lactat a una concentració de 14,4 mg/ml diluït en un tampó de 10 mM de TrisHCl pH 8,8. A continuació, s'addicionaren 20 µl/pou de INT a una concentració de 0,9 mg/ml en PBS. Posteriorment, s'afegiren 20 µl/pou de la solució iniciadora de la reacció consistent en 1,65 mg/ml de NAD<sup>+</sup>, 3 U/ml de diaforasa, 0,015% de BSA (*bovine serum albumin*, Sigma) i 0,6% de sucrosa (Sigma). A continuació, es deixà reposar la placa durant 30 minuts a temperatura ambient protegida de la llum. Finalment, s'addicionaren 40 µl/pou d'oxamat (Sigma) a 5,63 mg/ml en PBS com a solució finalitzadora de la reacció i es procedí a la lectura de les absorbàncies.



Pel que fa a la determinació de mort cel·lular mitjançant la doble tinció nuclear de PI (Sigma) i Hoechst 33342 (Sigma), aquests es van afegir directament als pous de la placa de 96 a una concentració final de 1 µg/ml i 2 µg/ml respectivament diluïts amb PBS. Posteriorment, es deixà transcorre un mínim de 10 minuts incubant la placa a 4°C. Passada la incubació, es visualitzaren i es preneren les corresponents imatges dels diferents nuclis tenyits a través del microscopi de fluorescència Nikon ECLIPSE TE2000-E acoblat a la càmera fotogràfica Hamamatsu ORCA-ER. La quantificació de la mortalitat es va analitzar a partir dels percentatges de mort obtinguts pel recompte de cèl·lules mortes (nuclis tenyits per PI) respecte el total de cèl·lules viables (nuclis tenyits per Hoechst 33342). La doble tinció nuclear, al seu torn, també va permetre avaluar en paral·lel la morfologia nuclear adquirida en cada condició.

#### **4. Anàlisi de morfologia nuclear**

##### **4.1. Tinció nuclear amb Hoechst 33258**

La morfologia nuclear amb Hoechst 33258 (Hoechst no permeable) s'analitzà en plaques de 96 pous. La tinció de la cromatina es realitzà a una concentració final de Hoechst 33258 (Sigma) del 0,5 µg/ml, on les cèl·lules es van fixar amb 2% de paraformaldehid (Sigma) en presència del 0,1% de NP-40 per contribuir a la permeabilització de l'agent intercalant. La solució de tinció va ser preparada en PBS i afegida directament al medi de cultiu. Transcorregut un temps mínim de 10 minuts d'incubació a 4°C, es procedí a l'anàlisi morfològic. Les imatges es van prendre a través del microscopi de fluorescència Nikon ECLIPSE TE2000-E esmentat anteriorment.

##### **4.2. Microscopia electrònica**

Les cèl·lules utilitzades per l'anàlisi morfològic a través de microscopia electrònica es van sembrar en plaques de 60 mm. Després dels corresponents tractaments, les cèl·lules es van recollir i resuspendre amb PBS suaument. Els pèl·lets cel·lulars es van sedimentar a 500 xg durant 5 minuts abans d'iniciar el protocol de microscopia electrònica. A continuació, les cèl·lules es van fixar amb una solució del 2,5 % de glutaraldehid i 2% de paraformaldehid (TAAB laboratories) en un tampó fosfat 100 mM pH 7,4 a 4°C durant dos hores. Les cèl·lules fixades es van portar al servei de microscopia electrònica de la UAB on van proseguir amb el protocol de preparació de les mostres.

#### **5. Anàlisi de degradació de l'ADN**

##### **5.1. Fragmentació d'alt pes molecular de l'ADN (HMW, *High Molecular Weight*)**

La fragmentació d'alt pes molecular de l'ADN es realitzà en cèl·lules sembrades en plaques de 35 mm. Abans de procedir al protocol HMW, les cèl·lules es van recollir i rentar amb PBS sedimentant els pèl·lets a 500 xg durant 5 minuts. A continuació, els pèl·lets cel·lulars es van resuspendre suaument amb 7,5 µl de RNAsa A (Roche) diluïda amb aigua a una concentració de 10 mg/ml, i es van mantenir en gel fins al moment de carregar-les al gel d'agarosa. A cada una de les mostres, es van afegir 7,5 µl del tampó de càrrega (10 mM TrisHCl pH 8,8, 50 % glicerol i 0,1% blau de bromofenol) just abans de realitzar-ne la càrrega.

La preparació del gel d'agarosa es va fer utilitzant un motlle de gels de 15 cm x 15 cm en el què es van afegir 150 ml d'un gel d'agarosa al 2 % amb tampó TBE (89 mM Tris-base, 89 mM àcid bòric i 2 mM EDTA, pH 8,0). En aquest suport, la pinta dels pouets es col·locà a 3,5 cm de

l'extrem superior. Un cop preparat el gel, s'enretirà la pinta i es tallà el tros del gel just per sobre dels pouets. La pinta es col·locà de nou a la seva ubicació original i l'espai buit del suport del gel d'agarosa s'omplí amb 50 ml d'un segon gel fet al 2% d'agarosa amb 2% de SDS i 64 µg/mL de Proteïnasa K (Novagen). Aquesta primera part del gel va permetre alliberar el ADN de les cèl·lules a partir de la llisi cel·lular induïda pel SDS i la degradació de les proteïnes acomplexades amb el ADN per l'efecte de la proteïnasa K. Constituïda aquesta part superior del gel, es submergí el gel en una cubeta que contenia el tampó TBE 0,5X. Un cop preparat el gel, es carregaren les diferents mostres deixant-les reposar 5 minuts abans d'iniciar la migració. L'anàlisi electroforètic es realitzà a 45V durant 16 hores. Posteriorment, es procedí a tenyir el gel amb una solució del 2 µg/mL de bromur d'etidi diluït amb aigua destilada. El gel s'incubà dues hores amb la solució de tinció i a continuació es realitzaren dos rentats amb aigua destilada de 30 minuts. El ADN es va visualitzar utilitzant un transil·luminador d'UV acoblat a una càmera fotogràfica (Syngene Gene Genius).

### 5.2. Fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (LMW, *Low Molecular Weight*)

S'han utilitzat dos mètodes per la determinació de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN. El primer es va basar en realitzar l'extracció de l'ADN amb fenol: cloroform: alcohol isoamílic (25:24:1) i la precipitació amb acetat d'amoni 7,5 M i etanol absolut. El segon mètode va consistir en la precipitació de l'ADN amb NaCl 1,5M i etanol absolut. En tots dos casos es partí de cèl·lules sembrades en una placa de 12 pous i es recolliren i rentaren les cèl·lules amb PBS. Els pèl·lets cel·lulars es van sedimentar a 500 xg durant 5 minuts.

#### Mètode d'extracció amb fenol: cloroform: alcohol isoamílic (25:24:1) i precipitació amb acetat d'amoni 7,5 M i etanol absolut

Després del rentat de PBS, el pèl·let de cèl·lules es va ressuspendre amb 250 µl amb aigua miliQ (bidestilada) suplementada amb 200 µg/ml de proteïnasa K i 20 µg/ml de RNasa A. A continuació, es van afegir 250 µl més però del tampó de llisi SDS 2X (20 mM Tris-HCl, pH 6,8, 300 mM NaCl, 2mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), 2% SDS) pel lateral dels tubs sense ressuspendre. Les mostres es van esclafar en un bany a 50°C durant 30 minuts per degradar les proteïnes extretes i eliminar el RNA present. Cada 10 minuts, les mostres es van agitar per inversió. Passats els 30 minuts, les mostres adoptaren un aspecte líquid sense cap essència de viscositat. En aquest punt es procedí llavors a l'extracció de l'ADN utilitzant un volum (500 µl) de fenol: cloroform: alcohol isoamílic (Sigma). Després d'afegir el fenol cloroform, les mostres es van barrejar vigorosament i, a continuació, es van centrifugar durant 15 minuts a 14.000 rpm a temperatura ambient. Posteriorment a la centrifugació, es van observar dues fases amb una interfase lipídica, quedant la fase aquosa en la part superior on és present el ADN extret, i la fase orgànica en la part inferior. A continuació, es procedí a traspasar amb molta cura la fase aquosa (400 µl). Posteriorment, es va precipitar el ADN amb dos volums (800 µl) d'etanol absolut fred i mig volum (200 µl) d'acetat amònic 7,5 M almenys durant 1 hora a -20°C. Passat el temps de la precipitació, les mostres es van centrifugar a 16.000 xg durant 10 minuts a 4°C i es descartà el sobrenedant per decantació. El pèl·let blanquinós de ADN precipitat es va rentar amb etanol del 70% i es centrifugà de nou a 16.000 xg durant 10 minuts a 4°C. Posteriorment, s'apartà el sobrenedant i es deixà assecar el pèl·let de ADN a temperatura ambient o, en alguns casos, a 37°C. A continuació, s'afegiren 40 µl del tampó TE (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1mM EDTA) suplementat amb RNasa A a una concentració final de 20 µg/ml pel lateral del tub sense arribar a ressuspendre el pèl·let de ADN. Per assolir la completa dissolució de l'ADN, les mostres s'escalfaren durant 30 minuts a 50°C. Passat aquest temps, es comprovà la dissolució de l'ADN en un estat líquid no

viscós i es procedí llavors a la càrrega de les mostres. Es carregà un cinqué de les mostres afegint glicerol a una concentració final del 10%. Les mostres es van carregar en un gel d'agarosa del 1,8% en TAE (40 mM Tris acetat, pH 7,5, 1mM EDTA). La migració electroforètica es realitzà utilitzant el tampó TAE 0,5X a 90V durant aproximadament 30 minuts. El gel es tenyí amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 µg/ml diluït amb aigua destilada durant 15 minuts amb dos posteriors rentats d'aigua destilada. El ADN es va visualitzar per mitjà del transil·luminador (UV) anteriorment anomenat.

#### Mètode de precipitació de l'ADN amb NaCl 1,5M i etanol absolut

Després del rentat amb PBS, el pèl·let cel·lular es va ressuspèndre amb 70 µl d'aigua miliQ amb l'addició posterior de 330 µl d'un tampó de llisi amb 100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 5 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2% SDS i suplementat amb 200 µg/ml de proteïnasa K. Les mostres es van escalfar a 50°C durant 30 minuts fins obtenir un extracte líquid no viscós. A continuació, s'afegiren 170 µl de NaCl 5 M i es mesclaren vigorosament les mostres per ser centrifugades a 14.000 rpm durant 15 minuts a temperatura ambient. Inmediatament després de la centrifugació, es traspassà la fase líquida a un tub nou amb molta cura i sense emportar-se restes cel·lulars del pèl·let precipitat per efecte de la sal addicionada. Posteriorment, es precipità el ADN amb un volum d'etanol absolut i després de la seva mescla per inversió suau es deixaren les mostres 1 hora a -20°C. A partir d'aquí, es procedí de la mateixa manera que l'anterior mètode.

#### **6. Extraccions de proteïna i Western Blot**

Les extraccions de proteïna per l'anàlisi de *Western Blot* es van realitzar a partir de cèl·lules provinents de plaques de 35 mm. Després de realitzar els corresponents tractaments, les cèl·lules es van recollir, rentar amb PBS i sedimentar a 500 xg durant 5 minuts. A continuació, els pèl·lets es van llisar amb 10 volums del tampó de llisi "SET buffer" (10 mM Tris-HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS) i escalfar a 95°C durant diferents cicles de 10 minuts fins obtenir uns extractes líquids no viscosos. L'extracció total de proteïna amb el "SET buffer" s'utilitzà per l'anàlisi de proteïna per *Western Blot*, mentre que de forma alternativa s'emprà l'extracció de proteïna amb el tampó de llisi NP-40 (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Igepal Ca-630), 1 mM PMSF) per l'assaig d'activitat de caspasa DEVDasa. En aquesta extracció, els pèl·lets de les cèl·lules es van ressuspèndre amb 5 volums del tampó de llisi NP-40 deixant incubar els llisats en gel durant 10 minuts. A continuació, es van centrifugar les mostres a 16.000 xg durant 15 minuts a 4°C i s'apartà el sobrenedant en tubs nous, ja freds. La concentració de la proteïna en tots dos tipus d'extraccions es va determinar a través de l'assaig Lowry (Bio-Rad DC protein assay, Bio-Rad). Els extractes totals de proteïna es van carregar en una quantitat d'entre 15 i 50 µg de proteïna i separar en gels de poliacrilamida-SDS. La migració electroforètica es va realitzar a 25 mA per gel emprant el tampó de migració (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1 % de SDS). Posteriorment, les proteïnes es van transferir en membranes de *Polyvinylidene difluoride* (PVDF) Immobilon-P (Millipore) prèviament activades amb metanol (Scharlau) i mantingudes a 4°C en el tampó de transferència (20% de metanol i Tris Glicina (25 mM Tris-HCl i 192 mM Glicina)) fins a la seva utilització. La transferència es va fer a 100V durant 1h i 15 minuts utilitzant el darrer tampó esmentat. Un cop transferides les proteïnes, les membranes es van bloquejar amb el tampó TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 150 mM i 0,1% Tween-20) amb 5% de llet desnatada i sense additius en pols durant una hora a temperatura ambient. Després del bloqueig, la membrana es va rentar 3 cops durant 5 minuts amb el tampó TBS-T. A continuació, s'incubà la membrana amb l'anticòs primari diluït en TBS-T durant 1h a temperatura

ambient o O/N (*overnight*) descrits en la taula I. Posteriorment, la membrana es rentà de nou amb TBS-T durant tres rentats de 5 minuts. Finalment, s'incubà la membrana amb el corresponent anticòs secundari (taula I) diluït amb TBS-T amb 2,5 % de llet desnatada i sense additius en pols durant una hora a temperatura ambient o bé, entre 2,5h i 4h a 4°C. A continuació, la membrana es va rentar altre cop amb TBS-T durant 3 rentats de 10 minuts. A partir de la peroxidasa conjugada als diferents anticossos secundaris incubats, es realitzà la reacció de quimioluminiscència per part de l'enzim conjugat utilitzant el sistema EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries). De forma alternativa i més freqüentment, la senyal quimioluminiscent de les membranes es va rebelar utilitzant ECL *homemade* preparat a partir de la mescla d'ECL1 (Tris-HCl 0,1M pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Àcid p-comàric) i ECL2 (Tris-HCl 0,1M pH 8,5, 6,3 mM Peròxid d'hidrogen).

Anticòs	Pes Molecular (proforma i/o fragments)	Font	Dilució	Casa comercial	Referència
$\alpha$ -Caspase-2 (11B4)	51 kDa, 32 kDa i 18 kDa	Rat	1 / 2000	Enzo Life Sciences	ALX-804-356
$\alpha$ -Caspase-9 (5B4)	45 kDa, 37 kDa i 35 kDa	Mouse	1 / 5000	MBL	M054-3
$\alpha$ -Caspase-3	32 kDa, 19 kDa i 17 kDa	Rabbit	1 / 2000	Cell Signaling Technology	9662
$\alpha$ -Caspase-6 (3E8)	34 kDa i 15 kDa	Mouse	1 / 2000	MBL	M070-3
$\alpha$ -Caspase-7	35 kDa i 20 kDa	Rabbit	1 / 2000	Cell Signaling Technology	9492
$\alpha$ -Fodrin (AA6)	240 kDa, 180 kDa, 150 kDa i 120 kDa	Mouse	1 / 10000	Millipore	MAB1622
$\alpha$ -Lamin A/C (JOL2)	74 kDa, 65 kDa, 42 kDa i 37 kDa	Mouse	1 / 2000	Abcam	Ab40567
$\alpha$ -p23 (JJ3)	23 kDa i 17 kDa	Mouse	1 / 10000	Novus Biological Europe	NB300-576
$\alpha$ -PARP (cleaved)	85 kDa	Rabbit	1 / 10000	Cell Signaling Technology	9542
$\alpha$ -ICAD/DFF45 (6B8)	45 kDa, 35 kDa, 24 kDa, 18 kDa i 11 kDa	Mouse	1 / 40000	MBL	M037-3
$\alpha$ -CAD/DFF40	40 kDa	Rabbit	1 / 500	Millipore	AB16926
$\alpha$ -PKM2	84 kDa	Mouse	1 / 5000	Abnova	H00005315-A01
$\alpha$ -Topoisomerase I	90 kDa	Mouse	1 / 2000	TOPOGEN	2012-4
$\alpha$ -Cytochrome C (7H8.2C12)	15 kDa	Mouse	1 / 5000	BD Pharmingen	556433
$\alpha$ -Smac/DIABLO	25 kDa	Rabbit	1 / 5000	ProSci	2409
$\alpha$ -Bcl-X <sub>L</sub> (2H12)	26 kDa	Mouse	1 / 5000	Sigma	B9429
$\alpha$ -Mouse IgG	-	Rabbit	1 / 20000	Sigma	A9044
$\alpha$ -Rabbit IgG	-	Goat	1 / 20000	Sigma	A0545
$\alpha$ -Rat IgG	-	Goat	1 / 20000	Sigma	A9037

Taula I. Llistat d'anticossos primaris i secundaris utilitzats.

## 7. Anàlisi d'activitat de caspases: assaig d'activitat DEVDasa

L'anàlisi d'activitat de caspases s'executà utilitzant el substrate de caspases fluorogènic N-acetyl-DEVD-afc (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) (Calbiochem). L'emissió de fluorescència succeïa quan la molècula afc del substrate s'alliberava del pèptid DEVD. Els extractes amb activitat de caspases reconeixien aquest tetrapèptid (principalment les caspases executores 3 i 7) i permetien l'escisió del substrate fluorogènic després del residu aspàrtic final contribuint així, a l'emissió de la senyal fluorescent per mitjà d'afc.

L'anàlisi d'activitat de caspases es va fer partint de cèl·lules sembrades en plaques de 35 mm i emprant 20 µg d'extractes proteics obtinguts mitjançant la llisi amb el tampó d'extracció NP-40 (veure apartat 5.6. Extraccions de proteïna i *Western Blot*). S'utilitzaren plaques de 96 pous addicionant 50 µl dels extractes proteics diluïts amb el tampó de llisi NP-40 més 50 µl del tampó d'activitat 2x (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 10 mM DTT, 20% sucrosa, 2 mM PMSF i 40µM del substrate Ac-DEVD-afc). La incubació es va realitzar a una temperatura de 37°C i en triplicats. La lectura de la senyal fluorescent es va fer mitjançant l'espectrofluorímetre BIO-TEK Synergy HT amb un filtre d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de 460 nm. Les mesures es van prendre durant una cinètica de 12 hores amb una mesura cada hora.

## 8. Subfraccionament cel·lulars

### 8.1. Subfraccionament citoplasmàtic

El subfraccionament citoplasmàtic es dugué a terme emprant cèl·lules provinents de plaques de 35 mm. Després dels diferents tractaments, les cèl·lules es van recollir, rentar amb PBS i sedimentar a 500 xg durant 5 minuts. A continuació, es realitzà l'extracció de proteïna dels diferents pèl·lets per mitjà d'un tampó de subfraccionament citosòlic amb 70 mM sucrosa, 220 mM manitol, 5 mM HEPES-KOH pH 7,2, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0,01% digitonina, 1 mM PMSF i 1 mM DTT. Els pèl·lets de les cèl·lules es van resuspendre amb 5 volums d'aquest tampó i s'incubaren en gel durant 5 minuts. Posteriorment, es realitzaren varies centrifugacions seriadades dels llisats a 4 °C durant un minut en les que s'anava apartant el sobrenedant i centrifugant de nou aquest en l'ordre de 1.000 rcf, 3.000 rcf, 8.000 rcf i 16.000 rcf. Els extractes citoplasmàtics es van quantificar per Lowry i analitzar per *Western Blot*.

### 8.2. Subfraccionament nuclear

El protocol de subfraccionament nuclear es realitzà utilitzant cèl·lules sembrades en plaques de 60 mm. Després de realitzar els diferents tractaments, les cèl·lules es van recollir, rentar amb PBS i sedimentar a 500 xg durant 5 minuts. Posteriorment, es van resuspendre els pèl·lets amb 100 µl del tampó A (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,34 M sucrosa, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,1% Tritó X-100, 1 mM PMSF). A continuació, s'incubaren les cèl·lules durant 5 minuts en gel i els llisats es van centrifugar durant 4 minuts a 1.300 xg a 4 °C. El sobrenedant es va apartar en tubs nous frescos i centrifugar de nou a 16.000 xg a 4 °C durant 15 minuts. La fracció citoplasmàtica (C) s'obtingué a partir del sobrenedant resultant. El pèl·let de nuclis obtingut en la primera centrifugació es va rentar dos cops amb el tampó A sense tritó (50mM Tris-HCl, pH 6,8, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF) utilitzant el mateix volum que l'emprat en la llisi (100 µl) durant 4 minuts a 1300 xg i 4 °C. Posteriorment, la fracció nuclear es va llisar amb 100 µl del tampó B (3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 1mM DTT, 1 mM PMSF) durant 15 minuts en gel. A continuació, els llisats es van centrifugar a 1.700 xg a 4 °C

durant 4 minuts. Els sobrenedants resultants es van considerar com a la fracció nucleoplasmàtica (N1) i els pèl·lets derivats es van rentar un cop amb el tampó B a 1.700 xg durant 4 minuts a 4 °C utilitzant el mateix volum que l'emprat en la llisi. Els darrers pèl·lets nuclears es van ressuspndre amb 100 µl de "SET buffer" i escalfar a 95 °C durant diferents cicles de 10 minuts fins obtenir els corresponents extractes totalment líquids i transparents. La fracció resultant es va considerar com a la fracció cromatínica (N2). Els diferents extractes proteics es van quantificar per l'assaig de Bio-Rad de Lowry. Finalment, es carregaren entre 10 i 15 µg de proteïna de cada fracció per l'anàlisi de *Western Blot*.

### 9. Detecció de les espècies reactives de l'oxigen (ROS)

La producció de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) intracel·lular es detectà mitjançant la sonda de fluorescència DHE (*Dihydroethidium*) (Sigma). DHE és permeable a la cèl·lula i en presència de ROS s'oxida a Eth (*ethidium*) preferentment per l'anió superòxid. Eth intercala el ADN i emet una senyal de fluorescència vermella amb una longitud d'ona d'excitació a 528 nm i d'emissió a 617 nm.

L'anàlisi de detecció dels ROS es realitzà utilitzant cèl·lules sembrades en una placa de 24 pous. Després de realitzar els diferents tractaments, les cèl·lules es van recollir, rentar amb PBS i sedimentar a 500 xg durant 5 minuts. Posteriorment, el pèl·let de cèl·lules es va ressuspndre amb 800 µl de DHE a una concentració de 10 µM diluït amb PBS fred. La incubació de les mostres amb la sonda es realitzà durant 5 minuts i en gel. Posteriorment, la senyal fluorescent cel·lular s'analitzà per citometria de fluxe mitjançant el detector FL3 del citòmetre Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). L'anàlisi citomètric es realitzà amb l'adquisició de 10.000 esdeveniments i les dades es van processar a través del *software* CXP. Els resultats es van representar en histogrames segons el número d'esdeveniments en els eixos de les y, respecte la intensitat de la senyal fluorescent vermella en els eixos de les x. Les dues poblacions cel·lulars es van separar per una línia negra discontinua diposant a la banda esquerra d'aquesta les cèl·lules negatives per la detecció dels ROS, i a la banda dreta, la població de cèl·lules positives per la producció intracel·lular dels ROS. Per a cada condició, es va indicar el percentatge de cèl·lules positives per la detecció dels ROS.

## **VI. RESULTATS**







## 1. Queleritrina indueix una mort cel·lular de forma homogènia en absència del fenotip nuclear apoptòtic en les cèl·lules SH-SY5Y

Tal i com s'ha especificat a l'apartat d'hipòtesi i objectius, com a punt de partida, es va procedir a analitzar el fenotip nuclear de mort induït per un ampli panell d'insults citotòxics en la línia cel·lular derivada de neuroblastoma humà SH-SY5Y. Per fer-ho, es realitzà un anàlisi de la morfologia nuclear mitjançant la tinció de la cromatina amb el colorant bisbenzimidazol de Hoechst i s'avaluaren els nivells de supervivència a través de la reducció del compost MTT, després de sotmetre les cèl·lules SH-SY5Y durant 24 hores a un tractament individualitzat de quinze insults citotòxics diferents (Figura R1).

Els diferents compostos amb els quals es tractaren les cèl·lules, incloïen una àmplia varietat de mecanismes de citotoxicitat. En concret es van emprar: estaurosporina, un potent inhibidor de quinases d'ampli espectre (Karaman, Herrgard et al. 2008); rotenona, compost que interfereix en el transport electrònic mitocondrial inhibint el complex I, tot i que també es descriu pel seu efecte despolimerització de microtúbuls mitjançant la seva unió a tubulina (Testa, Sherer et al. 2005; Srivastava and Panda 2007); queleritrina, inhibidor de PKC i de la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub>, capaç també de manifestar propietats intercalants en l'ADN (Herbert, Augereau et al. 1990; Chan, Lee et al. 2003; Bajaj, McLean et al. 1990); camptotecina, inhibidor de la topoisomerasa I (Liu, Desai et al. 2000); etopòsid, inhibidor de la topoisomerasa II (van Maanen, Retel et al. 1988); oxaliplatí, agent que s'uneix de forma covalent a l'ADN preferentment per interacció a la posició N7 de les bases guanina que, per formació d'adductes amb aquestes, impedeix la replicació i transcripció (Graham, Mushin et al. 2004); colxicina i nocodazol, inhibidors de la polimerització dels microtúbuls per la seva unió a la tubulina de forma reversible i irreversible respectivament (Salmon, McKeel et al. 1984; Samson, Donoso et al. 1979; Hugon, Bennett et al. 1987); thapsigargina, inhibidor de la bomba de calci del reticle endoplasmàtic (SERCA, *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*), pel que incrementa la concentració de calci al citosol (Jacobs and Kronman 1977; Wictome, Henderson et al. 1992); Ac-LLN (tripèptid N-Acetil-Leu-Leu-Norleu), potent inhibidor de cathepsina L amb capacitat també d'inhibir la cathepsina B, les calpaïnes I i II (Sasaki, Kishi et al. 1990; Tsubuki, Saito et al. 1996); Ac-LLM (tripèptid N-Acetil-Leu-Leu-Met), compost amb les mateixes característiques que Ac-LLN però amb més potència a nivell d'inhibició de la calpaïna I (Sasaki, Kishi et al. 1990; Tsubuki, Saito et al. 1996; Vinitsky, Michaud et al. 1992); Z-FL (dipèptid Z-Phe-Leu), inhibidor de cathepsina S, tot i que de manera feble també pot inhibir la cathepsina B (Sasaki, Kishi et al. 1990; Chen, Chang et al. 2011); MG132 (tripèptid Z-Leu-Leu-Leu), inhibidor de calpaïnes i principalment de les activitats proteolítiques del proteosoma 20S PGPH (*peptidyl-glutamyl peptide hydrolyzing*), la qual realitza un trencament posterior a residus àcids, i de les activitats similars a la de la tripsina (*trypsin-like*) amb un trencament peptídic després de residus bàsics i a la de la quimiotripsina (*quimiotrypsin-like*) amb un processament proteolític posterior a residus hidrofòbics (Tsubuki, Saito et al. 1996; Prasad, Atul et al. 2013); Z-LLF (tripèptid Z-Leu-Leu-Phe), inhibidor de calpaïnes, cathepsines i principalment de l'activitat *quimiotrypsin-like* del proteosoma 20S (Tsubuki, Saito et al. 1996; Sasaki, Kishi et al. 1990; Vinitsky, Michaud et al. 1992); i Z-LLnV (tripèptid Z-Leu-Leu-norVal), que comparteix les mateixes dianes que Z-LLF però sense inhibir les cathepsines (Tsubuki, Saito et al. 1996; Vinitsky, Michaud et al. 1992).

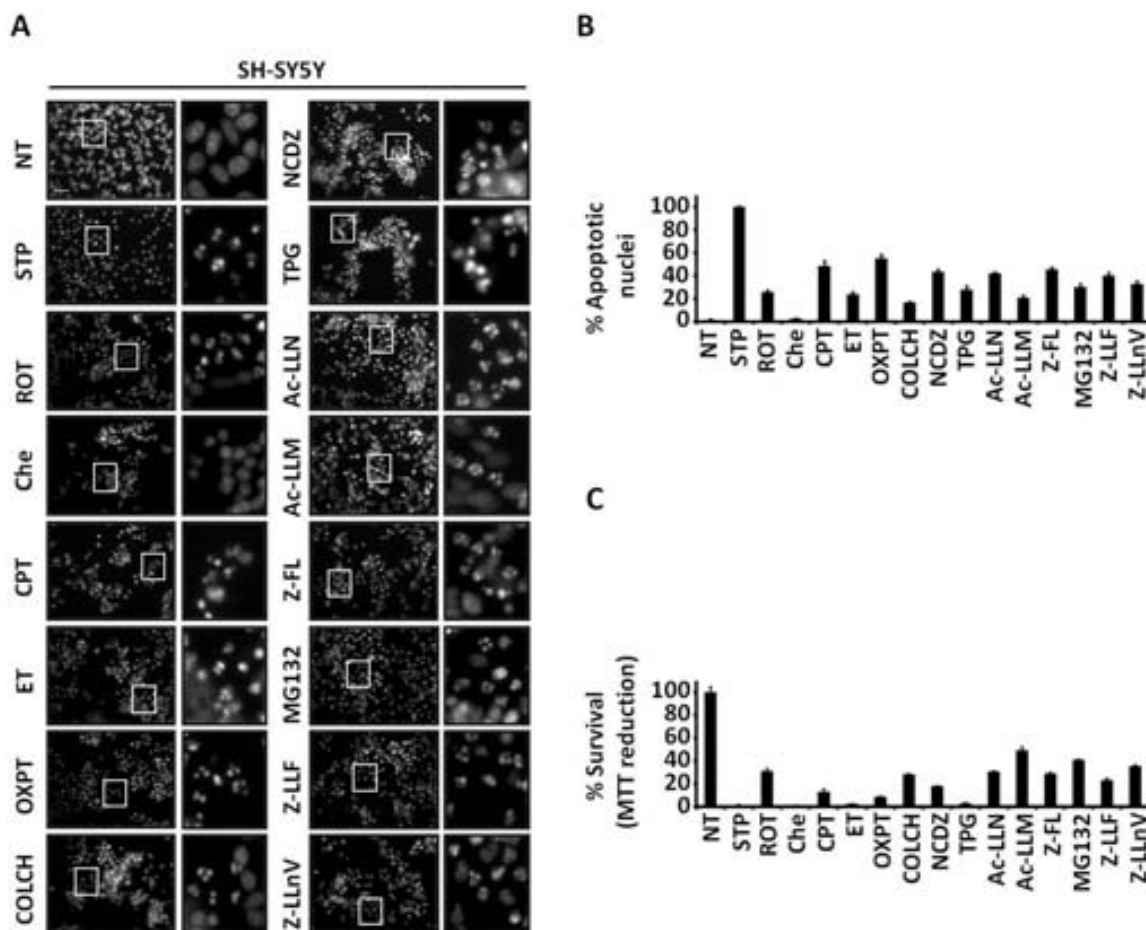
Tal i com s'observa en la figura R1A, tots els estímuls citotòxics emprats en les cèl·lules SH-SY5Y van induir una morfologia de tipus apoptòtica a excepció del compost de queleritrina, ja

que en aquest tractament les cèl·lules van mostrar un fenotip nuclear sense cap signe de condensació rellevant de la cromatina ni fragmentació del nucli, característics d'una morfologia apoptòtica. En concordança, el gràfic de recompte de nuclis apoptòtics va revelar una absència d'aquests durant el tractament amb queleritrina (Figura R1B). L'única diferència del fenotip nuclear no apoptòtic induït per aquest compost respecte al del control provinent de les cèl·lules no tractades (NT), semblava caracteritzar-se per una reducció del tamany nuclear (Figura R1A). Per altra banda, dels 15 compostos emprats, estaurosporina era l'insult citotòxic que provocava el percentatge de nuclis apoptòtics més alt (99,72%) respecte al control de les cèl·lules no tractades (1,31%) (Figura R1B). Després d'estaurosporina, els compostos que induïen una major quantitat de nuclis apoptòtics van ser: l'oxaliplatí (54,83%), la camptotecina (48,20%), Z-FL (45,13%), nocodazol (43,19%), Ac-LLN (41,92%) i Z-LLF (39,98%) (Figura R1B). Per contra, els estímuls citotòxics que van induïr un baix percentatge de nuclis apoptòtics en comparació als provocats en el tractament d'estaurosporina van ser: la colxicina (16,43%), Ac-LLM (20,42%), etopòsid (23,42%), rotenona (25,63%) i thapsigargina (27,59%) (Figura R1B).

En paral·lel, l'assaig de supervivència MTT ens va permetre constatar que la morfologia nuclear induïda per queleritrina corresponia a un fenotip de mort, donat que els nivells de supervivència es van reduir després del tractament amb aquest alcaloide (Figura R1C). A més, l'anàlisi de viabilitat cel·lular ens va permetre establir que aquest compost, juntament amb l'estaurosporina, eren els dos agents més citotòxics del conjunt d'insults testats, però provocant un fenotip nuclear de mort diferent (Figura R1C). No obstant, altres agents citotòxics també van desencadenar una disminució important dels nivells de supervivència cel·lular. Per una banda, van destacar els tractaments amb oxaliplatí, camptotecina o nocodazol. Aquests compostos, que havien induït percentatges de nuclis apoptòtics rellevants respecte al control no tractat però no tan elevats com els provocats per estaurosporina, van comprometre els nivells de supervivència cel·lular amb percentatges del 8,37%, 12,83% i 17,64%, respectivament (comparar figures R1B i R1C). D'altra banda, cal esmentar el cas de l'etopòsid, la thapsigargina, la colxicina i la rotenona. Aquests agents citotòxics van induir uns percentatges de nuclis apoptòtics més baixos que els anteriors compostos i que els provocats per estaurosporina, però van ser capaços igualment de reduir els nivells de supervivència cel·lular obtenint percentatges del 2,14%, 2,52%, 27,90%, i 30,77% respectivament (comparar figures R1B i R1C). Per tant, totes aquestes dades ens van permetre constatar que, en major o menor grau, aquests estímuls citotòxics estaven induint processos de mort heterogènics caracteritzats per la presència de morfologies nuclears apoptòtiques i no apoptòtiques.

Per altra banda, el conjunt de les dades ens van permetre establir algunes relacions entre els diferents mecanismes de citotoxicitat desencadenats en cada un dels compostos i el tipus i predominància del fenotip nuclear de mort manifestat en cada un dels tractaments. Així, per exemple, els resultats analitzats ens permeten associar que la inhibició de calpaïnes, cathepsines, proteosoma o quinases, provocaven processos de mort amb percentatges de nuclis apoptòtics significatives respecte a les cèl·lules no tractades. Pel que fa als mecanismes de genotoxicitat, les dades indiquen que aquests també es poden relacionar amb un percentatge de nuclis apoptòtics important, a excepció dels processos de mort derivats de la inhibició de la topoisomerasa II i de l'efecte intercalant en l'ADN. Aquests darrers mecanismes de citotoxicitat s'associen a la manifestació predominant de fenotips nuclears de mort no apoptòtica. Referent als processos de mort relacionats amb la inducció d'una despolimerització dels microtúbuls, els resultats no permeten establir una relació directa amb un fenotip de mort en concret. Per últim, els mecanismes de citotoxicitat que promouen un increment en les concentracions de calci citosòlic, o bé interfereixen en el transport electrònic mitocondrial, també es relacionen en major o menor grau

amb la presència de fenotips nuclears de mort no apoptòtica. En qualsevol cas, el conjunt de les dades suggereixen que la majoria d'estímuls citotòxics provoquen processos de mort heterogènics donada la co-existència de fenotips nuclears apoptòtics i no apoptòtics en condicions de citotoxicitat cel·lular. No obstant, aquest no és el cas ni d'estaurosporina ni de queleritrina. Estaurosporina indueix un procés de mort homogeni amb la presència de fenotips nuclears apoptòtics. En canvi, queleritrina desencadena també un procés de mort homogeni però compatible amb la manifestació d'un fenotip nuclear de mort no apoptòtica.



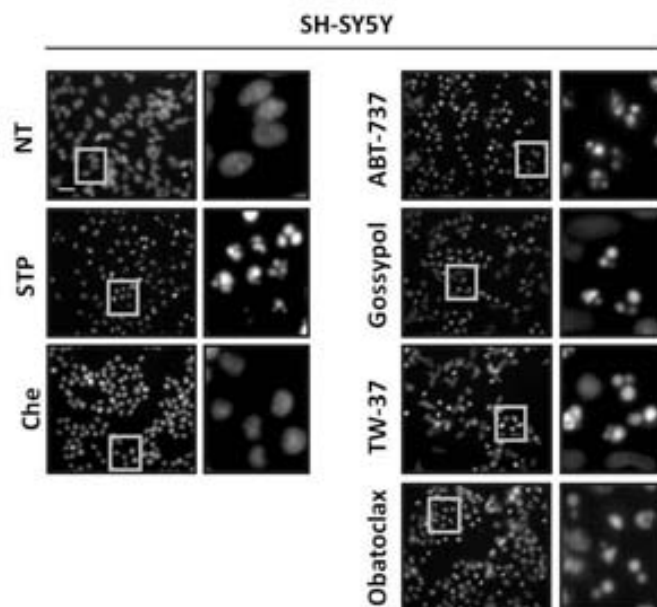
**Figura R1. Estudi del fenotip nuclear de mort provocat per diferents insults citotòxics en les cèl·lules SH-SY5Y.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 1  $\mu$ M de STP, 100  $\mu$ M de rotenona (ROT), 40  $\mu$ M de queleritrina (Che), 20  $\mu$ M de camptotecina (CPT), 100  $\mu$ M d'etopòsid (ET), 50  $\mu$ M d'oxaliplatí (OXPT), 10  $\mu$ g/ml de colchicina (COLCH), 50  $\mu$ M de nocodazol (NCDZ), 50  $\mu$ M de thapsigargina (TPG), 50  $\mu$ M d'Ac-LLN, 50  $\mu$ M d'Ac-LLM, 50  $\mu$ M de Z-FL, 25  $\mu$ M de MG132, 20  $\mu$ M Z-LLF o 20  $\mu$ M de Z-LLnV durant 24h. (A) Imatges representatives de l'anàlisi de la morfologia nuclear induïda pels diferents tractaments mitjançant la tinció nuclear amb Hoechst 33258. Els panells laterals són magnificacions de les cèl·lules enquadrades en els panells centrals. La barra blanca indica 50  $\mu$ m. (B) Percentatge de nuclis apoptòtics obtingut pel recompte d'aquests respecte els nuclis totals tenyits amb Hoechst 33258 i (C) determinació de la supervivència cel·lular mitjançant la tècnica de reducció del compost MTT en cada un dels diferents tractaments esmentats.

## 2. Tots els BH3 mimètics utilitzats, a excepció de queleritrina, indueixen una mort cel·lular caracteritzada per la presència de morfologies nuclears apoptòtiques en les cèl·lules SH-SY5Y

Els compostos BH3 mimètics es caracteritzen per inhibir els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 mitjançant la seva interacció amb el solc hidrofòbic d'aquestes proteïnes (veure

apartat de 2.3.2.E. “Estratègies terapèutiques en l’apoptosi intrínseca: BH3 mimètics”). Queleritrina es considera un compost d’aquest tipus per la seva capacitat d’inhibir la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub> (Chan, Lee et al. 2003; Taylor, Micha et al. 2006). Tenint en compte aquesta dada i que l’alcaloide era l’únic agent citotòxic dels 15 compostos analitzats capaç de provocar un fenotip nuclear no apoptòtic de forma homogènia en les cèl·lules SH-SY5Y, vam voler determinar si aquest era també induït per altres BH3 mimètics. Amb aquest propòsit, vam realitzar un anàlisi de la morfologia nuclear induïda per aquest tipus de compostos. Entre els quals, es van utilitzar: ABT-737, inhibidor de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Bcl-w (Zhai, Jin et al. 2006; Bruncko, Oost et al. 2007); gossypol, inhibidor de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Mcl-1 (Kitada, Leone et al. 2003; Wang, Nikolovska-Coleska et al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006); TW-37, inhibidor de Bcl-2 i Mcl-1, i amb menor afinitat també inhibeix Bcl-X<sub>L</sub> (Verhaegen, Bauer et al. 2006; Wang, Azmi et al. 2009; Mohammad, Goustin et al. 2007); i obatoclox, el qual pot inhibir tots els membres antiapoptòtics encara que amb menor afinitat que els altres BH3 mimètics (Wang, Nikolovska-Coleska et al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006) (per més informació sobre aquests, veure l’apartat de 2.3.2.E. “Estratègies terapèutiques en l’apoptosi intrínseca: BH3 mimètics”). Cal afegir, que l’estaurosporina es va utilitzar com a control de morfologia apoptòtica clàssica (Figura R2) i que s’emprà al llarg de tots els experiments com a control de mort apoptòtica canònica.

Tal i com s’observa en la figura R2, els diferents BH3 mimètics, a excepció de queleritrina, van induir una morfologia apoptòtica caracteritzada per una alta compactació de la cromatina i fragmentació del nucli que, a més a més, resultava ser similar a la provocada per estaurosporina. Les dades obtingudes permeten establir que la morfologia nuclear no apoptòtica desencadenada per queleritrina és exclusiva d’aquest compost i que no es pot, per tant, generalitzar al fenotip nuclear induït pels altres BH3 mimètics.

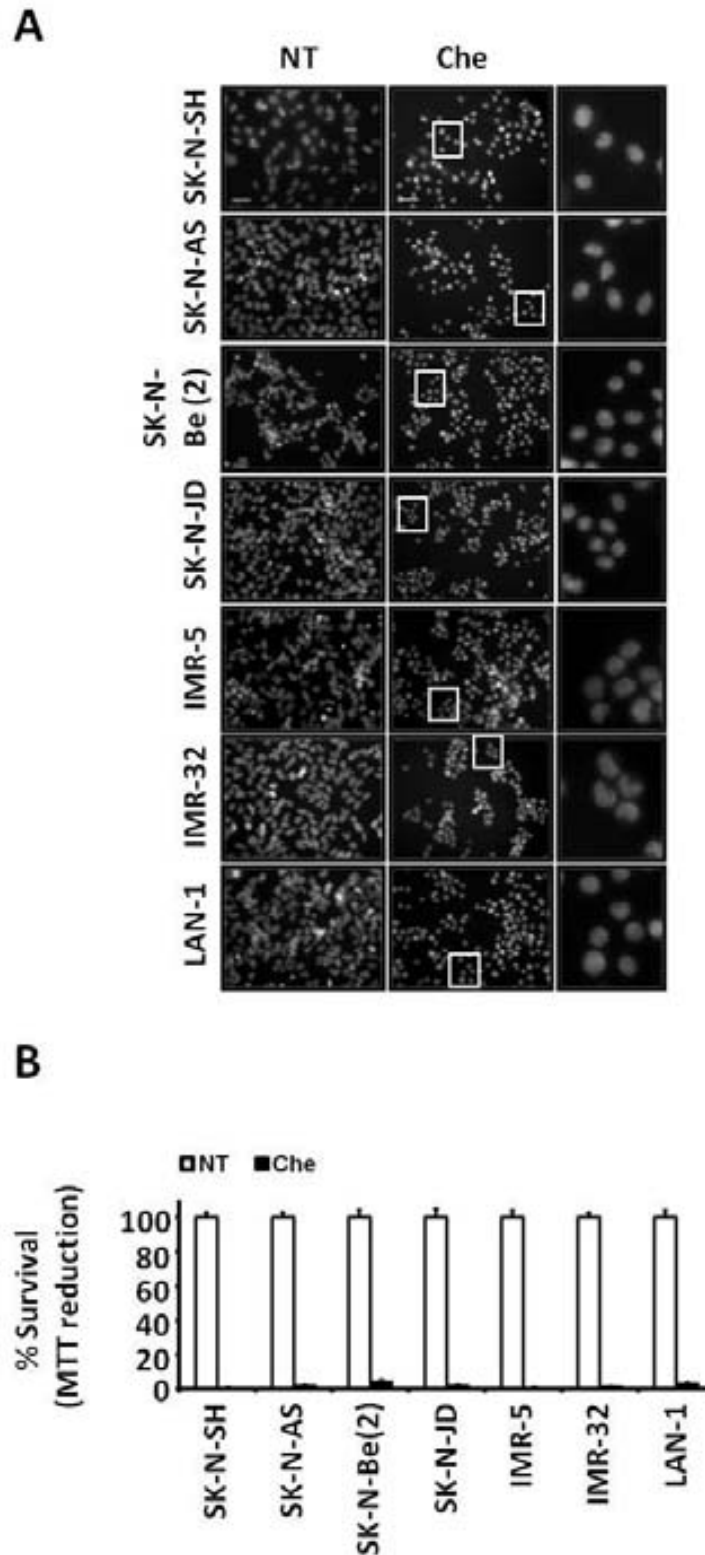


**Figura R2.** Anàlisi de la morfologia nuclear manifestada en les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament individualitzat amb diferents BH3 mimètics. Les cèl·lules SH-SY5Y es van deixar sense tractar (NT) o tractar amb 1 μM de STP, 40 μM de Che, 50 μM d’ABT-737, 25 μM de gossipol, 50 μM de TW-37 o 5 μM d’obatoclox durant 24h. Posteriorment, s’analitzà la morfologia nuclear mitjançant la tinció amb Hoechst 33258. Es mostren imatges representatives de la tinció nuclear per cada un dels diferents tractaments. Les cèl·lules enquadrades es magnifiquen en els panells laterals en cada una de les condicions. La barra blanca equival a 50 μm.

### **3. Queleritrina tampoc provoca l'aparició de nuclis apoptòtics en altres línies cel·lulars humanes derivades de neuroblastoma**

Els resultats anteriors mostraven que la morfologia nuclear no apoptòtica induïda per queleritrina era exclusiva d'aquest compost. En conseqüència, vam voler examinar si aquest tipus de fenotip nuclear de mort manifestat en les cèl·lules SH-SY5Y era present en altres línies cel·lulars humanes derivades de neuroblastoma humà. Per això, es realitzà un anàlisi morfològic amb bisbenzimidà de Hoechst i un estudi de la viabilitat cel·lular a través de l'assaig de supervivència MTT, sometent tot un panell de línies cel·lulars a un tractament de 24 hores amb aquest alcaloide. En concret, aquests anàlisis es dugueren a terme en les línies cel·lulars SK-N-SH, SK-N-AS, SK-N-Be(2), SK-N-JD, IMR-5, IMR-32 i LAN-1 (Figura R3). Totes aquestes línies van manifestar un fenotip nuclear caracteritzat per una absència de la morfologia apoptòtica després de ser tractades amb queleritrina, donat que no es detectà cap signe de fragmentació del nucli ni condensació de la cromatina (Figura R3A). A més, el fenotip nuclear detectat era similar a l'induït per queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y (comparar figures R3A i R1A). En paral·lel, l'anàlisi de viabilitat cel·lular mostrà una alta citotoxicitat desencadenada per queleritrina en totes les línies cel·lulars emprades, on els nivells de supervivència cel·lular es van reduir de forma dràstica en cada una d'elles respecte als seus controls sense tractar (comparar figures R1C i R3B).

Tot plegat permet establir que la mort cel·lular induïda per queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y en absència d'una morfologia apoptòtica, també és present en altres línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà i, a més a més, provocant elevats nivells de citotoxicitat cel·lular.



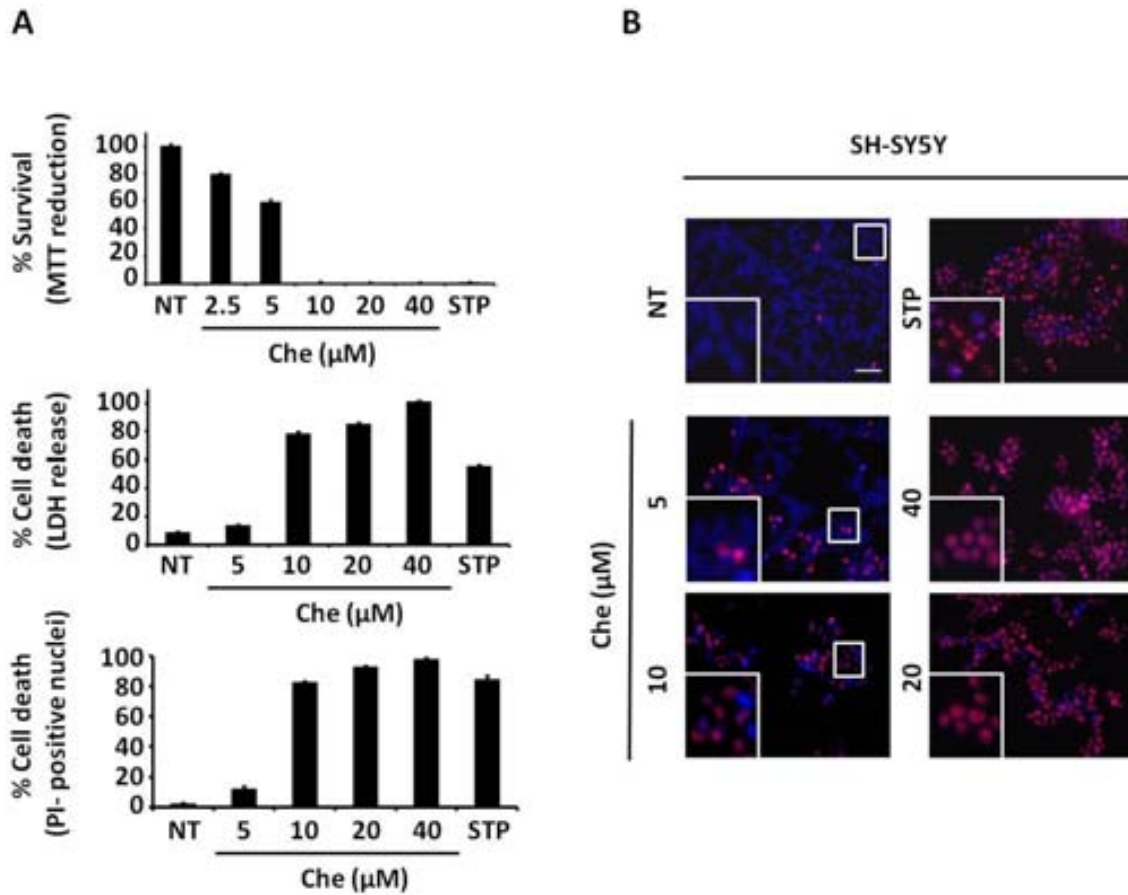
**Figura R3.** El fenotip nuclear de mort no apoptòtic induït per queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y és present en altres línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà. Diferents línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà (SK-N-SH, SK-N-AS, SK-N-Be(2), IMR-5, IMR32 i LAN-1) es tractaren amb 40  $\mu$ M de Che durant 24h i s'analitzaren respecte al seu control no tractat (NT). Per cada una d'aquestes línies s'examinà la morfologia nuclear mitjançant la tinció nuclear amb Hoechst 33258 (A) i la viabilitat cel·lular a través de l'assaig de supervivència MTT (B). (A) Les cèl·lules enquadrades en els panells centrals de l'anàlisi morfològic es magnifiquen als panells laterals. La barra blanca equival a 50  $\mu$ m. (B) Per cada una de les diferents línies cel·lulars emprades, les barres blanques de l'assaig de supervivència representen els valors obtinguts de les cèl·lules sense tractar i les negres, el de les cèl·lules tractades amb Che.

#### 4. Queleritrina indueix la hidròlisi de l'ADN en fragments d'alt pes molecular però no en fragments oligonucleosomals

El fenotip nuclear no apoptòtic induït per queleritrina en les diferents línies de neuroblastoma es va analitzar emprant una concentració de 40  $\mu\text{M}$  durant 24 hores de tractament (Figures R1, R2 i R3). Abans de prosseguir amb l'estudi del procés de mort cel·lular desencadenat per aquest compost, vam voler establir la concentració mínima citotòxica d'aquest i examinar si el fenotip nuclear provocat per l'alcaloide depenia de la dosi utilitzada. Per això, es realitzà un anàlisi del perfil de mort induït per diferents concentracions de queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y. Aquest estudi es realitzà mitjançant l'assaig de supervivència MTT i dues tècniques de quantificació de mort cel·lular basades en la detecció de l'enzim citosòlic lactat deshidrogenasa (LDH) al medi extracel·lular i en el recompte de nuclis positius per la tinció amb iodur de propidi (PI) respecte als totals tenyits amb bisbenzimidida de Hoechst (Figura R4A). Al mateix temps, aquest darrer assaig ens va permetre visualitzar el fenotip nuclear manifestat en cada un dels diferents tractaments realitzats (Figura R4B). Tots aquests assajos van indicar que la concentració mínima citotòxica de queleritrina era de 10  $\mu\text{M}$ , donat que amb aquesta dosi es detectà un 0,10% de supervivència cel·lular per MTT i un 78,33% i 82,51% de mortalitat, segons els respectius assajos d'alliberament de LDH i de recompte de nuclis positius per PI (Figura R4A). En aquest sentit, cal afegir que la concentració de 5  $\mu\text{M}$  no es podia considerar com a citotòxica, ja que malgrat un 41% de cèl·lules no fossin competents per reduir el MTT, no es van assolir percentatges de mort cel·lular prou significatius (13,46% i 12,02% segons els assajos respectius de LDH i de doble tinció de PI i Hoechst) respecte als detectats en les cèl·lules sense tractar (Figura R4A). Per altra banda, cal remarcar la considerable diferència de percentatges de mort cel·lular mostrats per les cèl·lules tractades amb 10  $\mu\text{M}$  de queleritrina en comparació a les sotmeses a estaurosporina (78,33% i 55,70% respectivament) segons l'assaig d'alliberament de LDH al medi extracel·lular (Figura R4A). Aquest fet va suggerir que els processos de mort induïts en cada cas havien de ser sensiblement diferents. Pel que fa a l'anàlisi morfològic, les cèl·lules van manifestar el mateix fenotip nuclear no apoptòtic en totes les concentracions de queleritrina que provocaven toxicitat cel·lular (entre un 80 i 100% de mort segons les dues tècniques de quantificació de mort emprades) (Figura R4). La concentració de 5  $\mu\text{M}$  induí un fenotip nuclear de mort que no prestà a considerar-se com a apoptòtic, donada l'absència de fragmentació nuclear i la manifestació d'un estat de condensació de la cromatina poc definit (Figura R4B). Tot plegat, estableix que la morfologia nuclear no apoptòtica induïda per queleritrina no s'altera ni quan les cèl·lules es tracten a la concentració mínima de toxicitat cel·lular, ni a concentracions superiors.

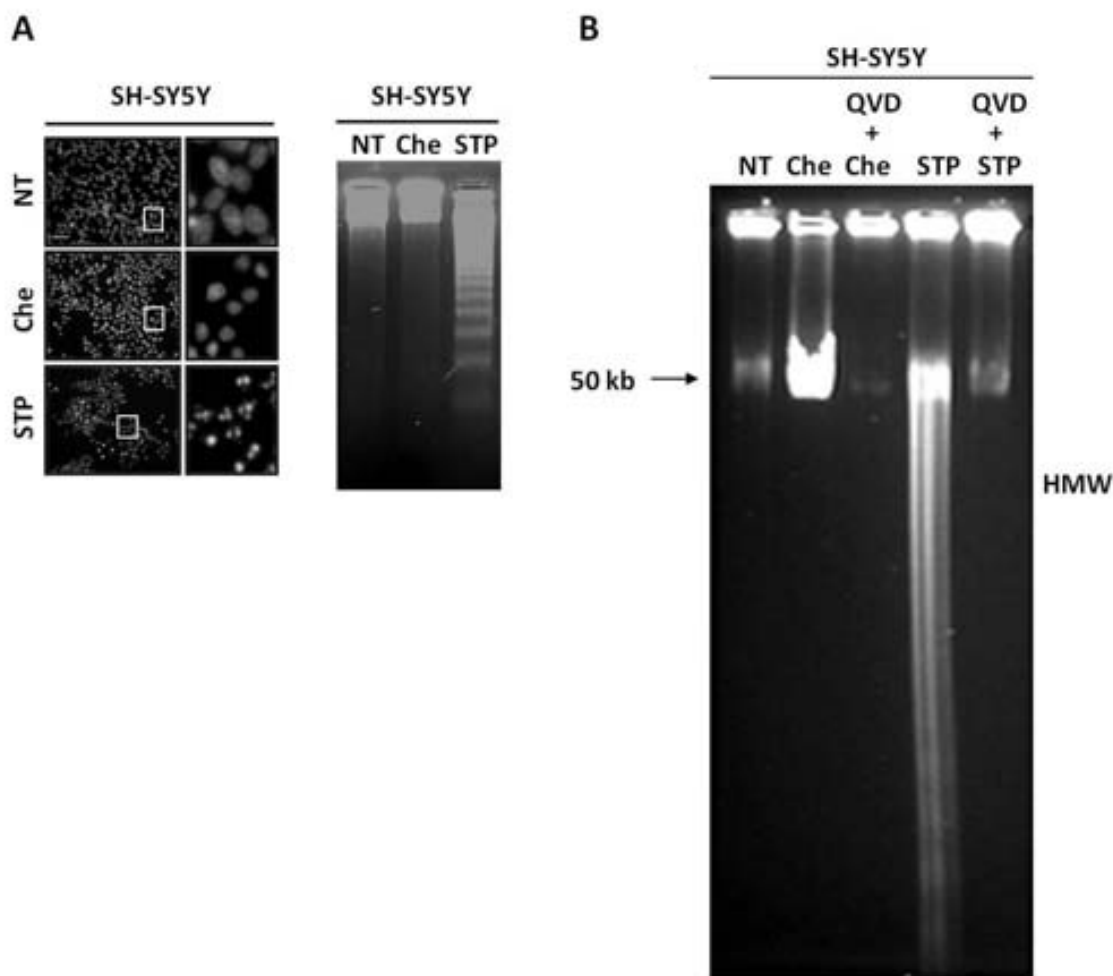
Tenint en compte aquests darrers resultats, a partir d'aquí es realitzaren tots els experiments emprant la concentració de 10  $\mu\text{M}$ . Posteriorment a l'anàlisi del fenotip nuclear de mort, vam voler examinar si les cèl·lules SH-SY5Y, eren capaces de manifestar la fragmentació apoptòtica de l'ADN en LMW (*low molecular weight*) després de ser sotmeses a un tractament de 24 hores amb queleritrina. Tal i com s'observa en la figura R5A, les cèl·lules tractades amb queleritrina no eren competents per degradar l'ADN en fragments oligonucleosomals. A més, l'absència d'aquesta fragmentació de l'ADN coincidia amb la detecció en paral·lel de la morfologia nuclear no apoptòtica induïda per aquest alcaloide i analitzada a través de la tinció amb bisbenzimidida de Hoechst (Figura R5A). En canvi, estaurosporina sí que va ser capaç d'induir la fragmentació LMW i de forma concomitant a la manifestació de la morfologia apoptòtica clàssica (o morfologia nuclear de tipus II) provocada per aquest insult en les cèl·lules SH-SY5Y (Figura R5A). Donada l'absència d'aquesta fragmentació de l'ADN en cèl·lules tractades amb queleritrina, es procedí a analitzar si aquesta era capaç d'induir la fragmentació de l'ADN en HMW (*high molecular weight*), que

usualment precedeix a la de tipus LMW. En aquest cas, l'anàlisi electroforètic d'aquesta degradació de l'ADN mostrarà la presència de fragments HMW en les cèl·lules que havien estat tractades amb queleritrina (Figura R5B). Inclús, aquesta degradació es detectà de forma més intensa en aquest tractament que en el realitzat amb estaurosporina (Figura R5B). A més, la fragmentació HMW s'evità quan l'inhibidor de caspases d'ampli espectre, Q-VD-OPh, era present al medi de cultiu, fet que establí aquesta degradació de l'ADN com a un fenomen dependent de caspases (Figura R5B).



**Figura R4.** Anàlisi del perfil de mort induït per diferents concentracions de queleritrina. Les cèl·lules SH-SY5Y es van deixar sense tractar (NT) o es van tractar durant 24h utilitzant les concentracions indicades de Che o la dosi de 1 μM pel cas de STP. **(A)** Anàlisi de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de supervivència cel·lular MTT, i els assajos de quantificació de mort cel·lular basats en l'alliberament extracel·lular de LDH i el recompte de nuclis positius a través de la tinció amb iodur de propidi (PI) respecte als totals tenyits amb Hoechst 33342. **(B)** Imatges de fluorescència obtingudes de la doble tinció de PI i Hoechst emprada en el recompte de nuclis postius per PI. Les cèl·lules viables es visualitzen en color blau a través de la seva tinció amb Hoechst i les cèl·lules mortes s'il·lustren en color rosa, per la doble tinció nuclear de PI i Hoechst. Les amplificacions de les imatges provenen de les cèl·lules emmarcades. L'escala equival a 50 μm.



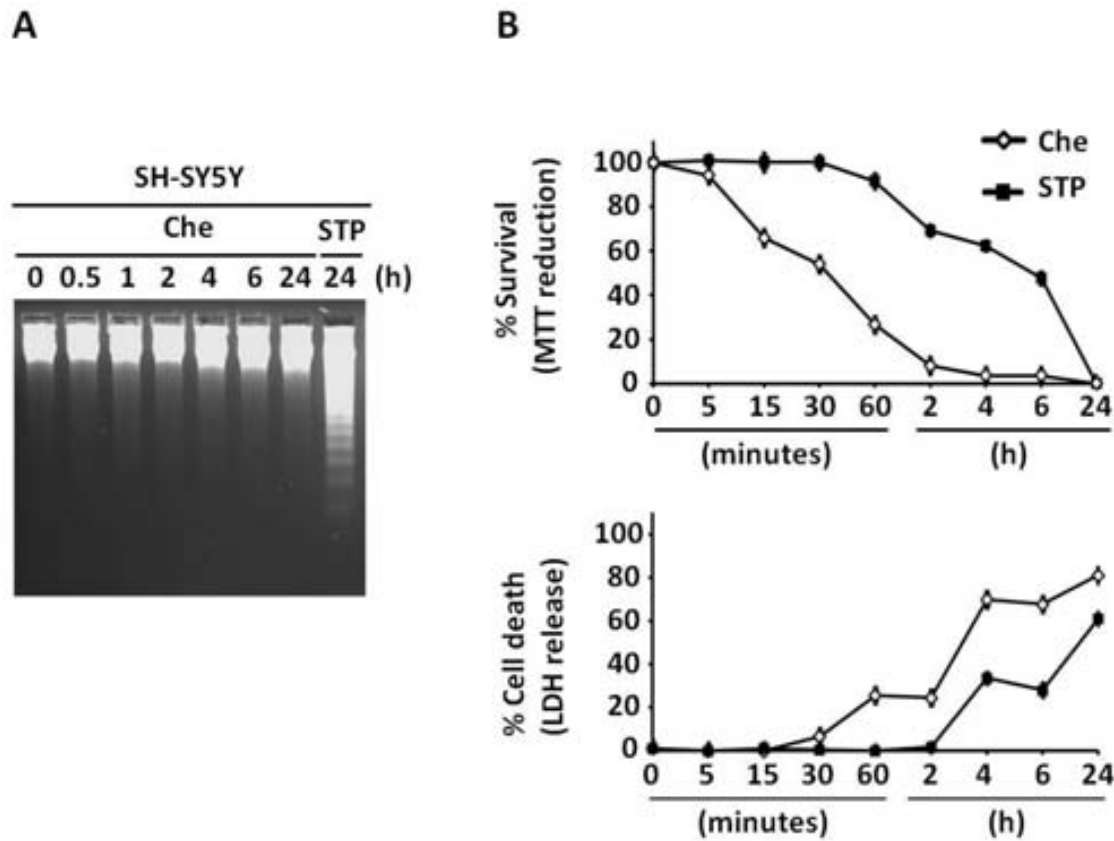


**Figura R5. Queleritrina és incapaç de desencadenar la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (LMW), però pot induir la degradació d'aquest en fragments d'alt pes molecular (HMW).** Les cèl·lules SH-SY5Y es van deixar sense tractar (NT) o es van tractar amb 10  $\mu$ M de Che i 1  $\mu$ M de STP durant 24h. **(A)** Anàlisi morfològic mitjançant la tinció amb Hoechst 33258 (panell de l'esquerre) i determinació de la degradació oligonucleosomal de l'ADN a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció de bromur d'etidi (panell de la dreta). Les magnificacions de l'anàlisi morfològic representen les cèl·lules emmarcades en les imatges centrals. L'escala equival a 50  $\mu$ m. **(B)** Anàlisi de la fragmentació d'alt pes molecular de l'ADN (HMW) en les condicions de tractament esmentades anteriorment i en co-tractament de 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP amb 20  $\mu$ M de Q-VD-Oph (QVD) durant 24h de tractament indicat com a QVD + Che o QVD + STP en cada cas.

Amb el propòsit de corroborar l'absència de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN detectada en les cèl·lules tractades amb queleritrina, es realitzà de nou aquest tipus d'anàlisi però duent a terme un curs temporal amb diferents temps de tractament, anteriors a les 24 hores (Figura R6A). En paral·lel, s'examinà el perfil de mort induït per queleritrina en aquests temps de tractament mitjançant l'assaig de supervivència cel·lular MTT i dues tècniques de quantificació de mort cel·lular, aquestes basades en la determinació de l'alliberament extracel·lular de LDH o en el recompte de nuclis positius per la tinció de PI respecte als totals tenyits amb bisbenzimidazol de Hoechst (Figura R6B i R7A). Tal i com mostra la figura R6A, la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN no es manifestà en cap dels diferents punts temporals de tractament amb queleritrina, malgrat els diferents assajos de viabilitat cel·lular mostraren, en gairebé tots els temps de tractament, una acció tòxica d'aquest alcaloide més potent que la desencadenada per estaurosporina (Figura R6B i R7A). En aquest sentit, cal remarcar que estaurosporina únicament va induir nivells de mort similars als provocats per queleritrina en el tractament de 24 hores, segons els perfils de

viabilitat cel·lular obtinguts en l'assaig MTT i en el recompte de nuclis positius per PI (Figura R6B i 7A).

En conjunt, tot plegat estableix que les cèl·lules SH-SY5Y pateixen un defecte en el mecanisme de degradació oligonucleosomal de l'ADN quan es sotmeten al tractament amb queleritrina, malgrat aquesta sigui capaç d'induir percentatges de mort cel·lular més elevats que els desencadenats per l'estaurosporina.



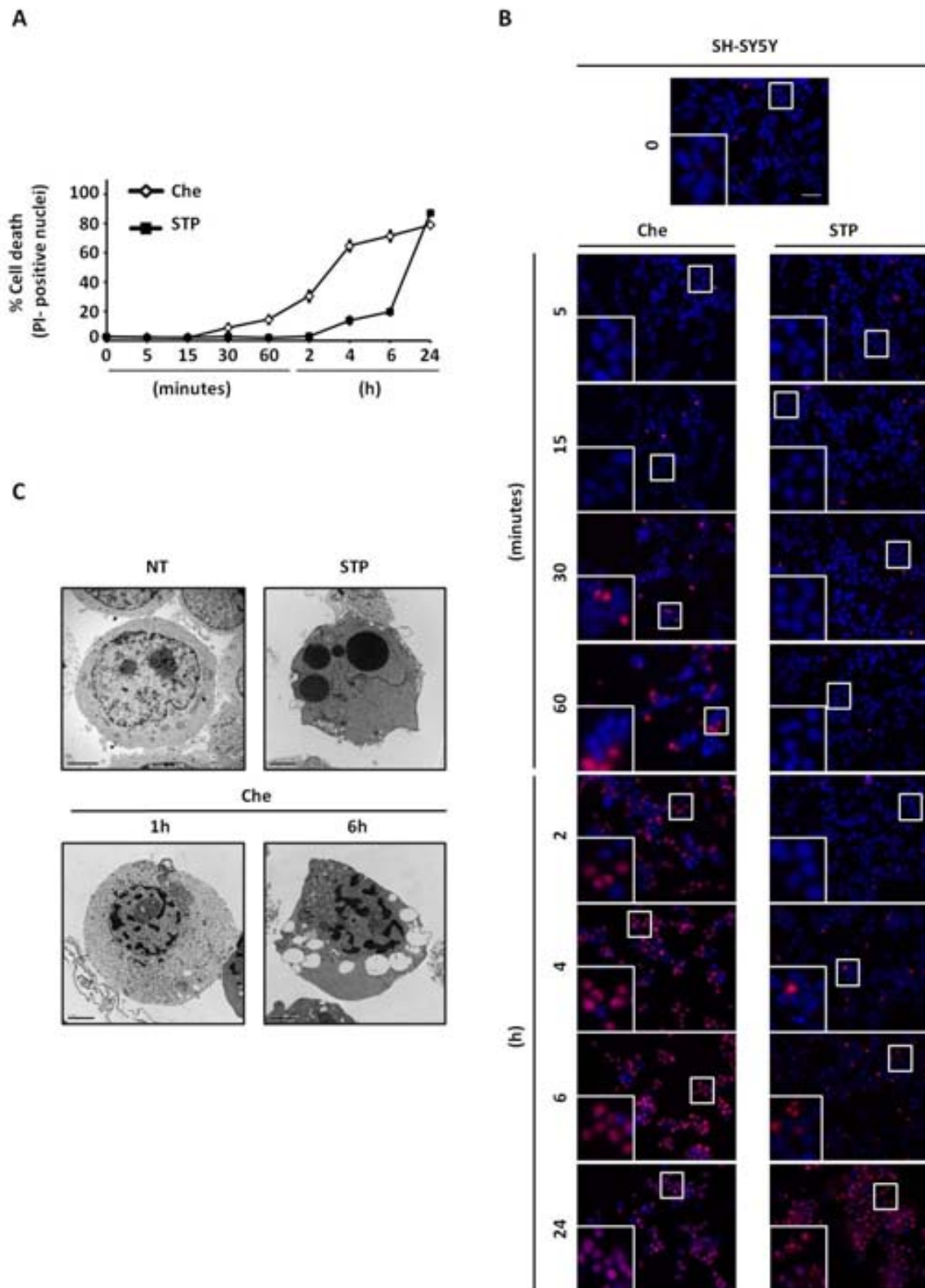
**Figura R6. Queleritrina indueix mort cel·lular en absència de fragmentació oligonucleosomal de l'ADN.** Les cèl·lules SH-SY5Y van tractar-se amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP al llarg dels diferents temps indicats. (A) Anàlisi electroforètic de la degradació oligonucleosomal de l'ADN mitjançant un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi. (B) Determinació de la viabilitat cel·lular a través de l'assaig de supervivència cel·lular MTT i la tècnica de quantificació de mort cel·lular basada en l'anàlisi de l'alliberament extracel·lular de LDH. El tractament de Che es representa pels rombes blancs, i el de STP s'indica amb quadrats negres.

### 5. La mort cel·lular induïda per la queleritrina és ràpida i sincrònica

Tenint en compte els resultats obtinguts en els perfils temporals de viabilitat cel·lular després del tractament amb queleritrina, aquests no solament van mostrar una elevada acció tòxica per part de l'alcaloide respecte a estaurosporina, sinó que també van revelar com aquesta toxicitat ja s'iniciava de forma anticipada durant la primera hora de tractament (Figures R6B i R7A). En canvi, les cèl·lules tractades amb estaurosporina van manifestar una pèrdua de viabilitat al llarg del temps més gradual i progressiva que en el cas de queleritrina (Figures R6B i R7A). Si realitzem un anàlisi més comparatiu d'aquests resultats, la principal diferència detectada entre els perfils citotòxics d'aquests dos compostos es manifestà en la tècnica de reducció del compost MTT, la qual ja indicà una afectació del metabolisme cel·lular a tan sols mitja hora de tractament amb

queleritrina, revelant un percentatge de supervivència del 54,04% (Figura R6B). Per altra banda, els anàlisis temporals dels diferents assajos de mort cel·lular també van permetre valorar que la toxicitat desencadenada per queleritrina durant la primera hora de tractament (25,68% i 19,87% segons les tècniques respectives de quantificació de LDH extracel·lular i recompte de nuclis positius per PI) era comparable a la detectada a les 6 hores de tractament amb estaurosporina (28,09% i 19,74% segons els respectius assajos de mesura de LDH extracel·lular i recompte de nuclis positius per PI) (Figures R6B i R7A). En canvi, l'assaig de viabilitat cel·lular MTT indicava que els nivells de supervivència de les cèl·lules tractades amb queleritrina després de mitja hora de tractament (54,04%) eren comparables amb els mostrats per les cèl·lules tractades amb estaurosporina durant 6 hores (47,71%) (Figura R6B).

En conjunt, tots aquests resultats van suggerir que queleritrina induïa un procés de mort cel·lular de forma anticipada respecte al desencadenat per estaurosporina. Per aquesta raó, vam voler analitzar el fenotip nuclear provocat per queleritrina al llarg del seu tractament. D'aquesta manera, es pretenia analitzar si aquest alcaloide podia induir la morfologia apoptòtica en algun dels temps de tractament anteriors a les 24 hores. La doble tinció nuclear de PI i Hoechst emprada per la quantificació temporal de mort cel·lular (Figura R7A) ens va permetre realitzar un anàlisi morfològic en cada un dels diferents temps de tractament amb queleritrina de forma comparativa als d'estaurosporina (Figura R7B). D'acord amb el gràfic de quantificació de mort cel·lular (Figura R7A), les diferents imatges obtingudes en l'anàlisi morfològic van mostrar un increment de cèl·lules mortes (visualitzades en color rosa per la doble tinció nuclear amb PI i Hoechst) respecte a la presència de cèl·lules viables al llarg dels diferents temps de tractament amb qualsevol dels dos estímuls citotòxics (Figura R7B). El fenotip nuclear de mort induït per queleritrina també es manifestà de forma prematura (ja detectat durant la primera mitja hora de tractament) respecte al mostrat per les cèl·lules tractades amb estaurosporina, el qual es detectà a partir de les 4 hores de tractament (Figura R7B). En el cas de queleritrina, la manifestació prematura dels nuclis positius per la tinció amb PI va coincidir amb la presència del mateix fenotip nuclear no apoptòtic mostrat anteriorment (comparar figura R7B amb figures R4A i R5A). A més, les imatges preses durant els diferents temps de tractament amb queleritrina semblaven mostrar un aspecte dels nuclis amb un tamany inferior respecte als del control no tractat i de forma prèvia a la seva tinció amb PI (Figura R7B). En canvi, les cèl·lules que morien al llarg del tractament amb estaurosporina van mostrar una morfologia apoptòtica clàssica que també es manifestà de forma prèvia a la seva tinció amb PI, però no de manera tan anticipada com en el cas de queleritrina (Figura R7B).



**Figura R7. El fenotip de mort no apoptòtic induït per queleritrina s'exhibeix de forma prematura en les cèl·lules SH-SY5Y.** Les cèl·lules SH-SY5Y es van tractar amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP en els diferents temps de tractament indicats. **(A)** La mort cel·lular es va quantificar pel recompte de nuclis positius per la tinció amb PI respecte als totals tenyits amb Hoechst 33342 en cada un dels diferents tractaments de Che (rombes blancs) i STP (quadrats negres). **(B)** Imatges representatives de fluorescència obtingudes a partir de la doble tinció nuclear de PI i Hoechst emprada per la quantificació de mort cel·lular. Les cèl·lules enquadrades es van magnificar en un quadre més gran ubicat a la banda esquerra i inferior de cada imatge. La barra blanca indica una escala de 50  $\mu$ m. **(C)** Imatges de microscopia electrònica de

les cèl·lules SH-SY5Y tractades a les dosis esmentades de Che o STP i captades als temps de tractament d'1h i 6h per Che, i 6h en el cas de STP. L'escala utilitzada s'indica en cada una de les imatges.

Amb el propòsit d'aprofundir en l'anàlisi de la morfologia nuclear provocada per queleritrina, es va procedir a examinar per microscopia electrònica les cèl·lules SH-SY5Y tractades amb aquest alcaloide a 1 i 6 hores de tractament (Figura R7C). Tal i com s'observa en la figura R7C, a una hora de tractament amb queleritrina les cèl·lules SH-SY5Y van mostrar una reducció del tamany del nucli en comparació al de les cèl·lules no tractades. A més, l'embolcall nuclear, tot i que encara es mantenia intacte, tenia un aspecte dilatat al comparar-se amb el de les cèl·lules control (Figura R7C). Cal afegir, que el fenotip nuclear que es detectà en aquest temps de tractament es caracteritzava sobretot per la presència de vàries masses irregulars de cromatina, gran part d'elles ubicades a la perifèria del nucli (Figura R7C). A les 6 hores, es detectà una major desestructuració del nucli amb un increment del tamany de les masses de cromatina, juntament amb un trencament de l'embolcall nuclear (Figura R7C). Pel que fa l'estat del citoplasma, les imatges electròniques van mostrar la presència de vacuoles a les 6 hores de tractament amb queleritrina (Figura R7C). Per altra banda, l'estaurosporina va induir clarament una morfologia apoptòtica de tipus II determinada per una compactació de la cromatina i fragmentació del nucli en forma de masses arrodonides envoltades per l'embolcall nuclear (Figura R7C).

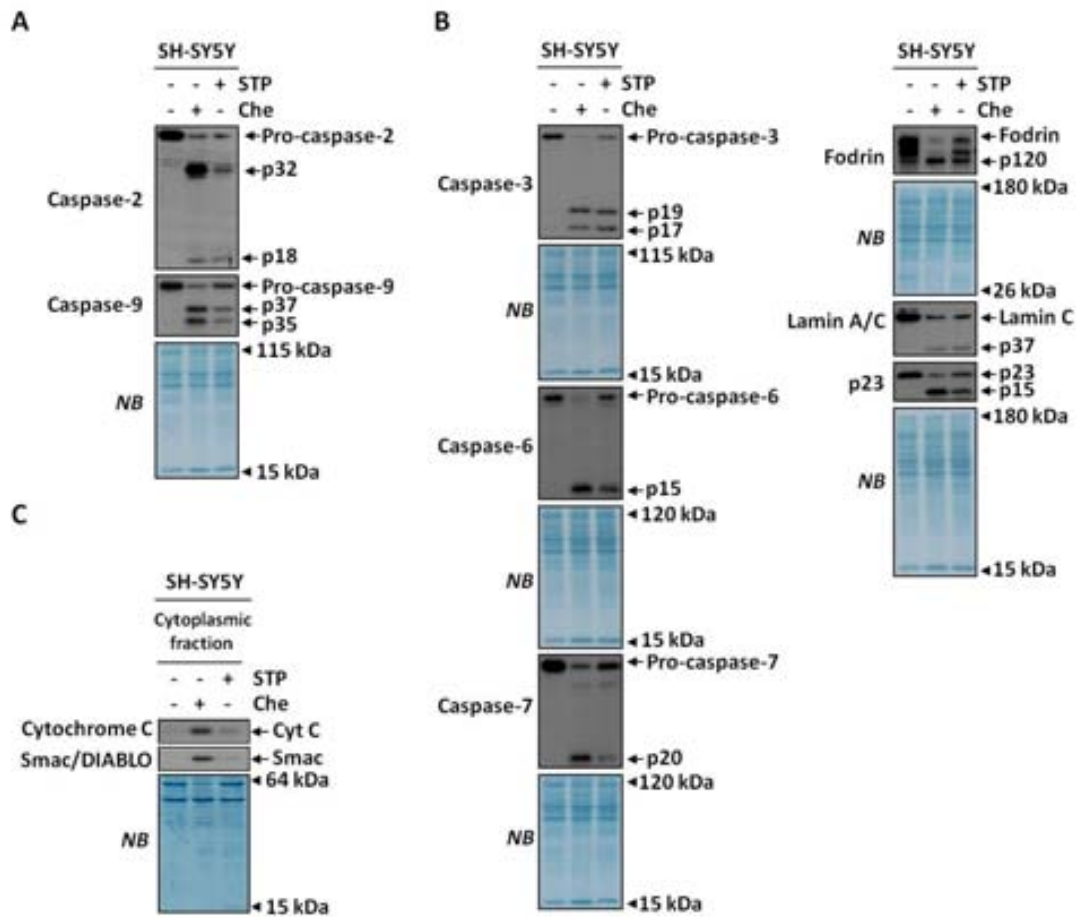
El conjunt d'aquestes dades indiquen que queleritrina és incapaç de provocar morfologies apoptòtiques nuclears i que el desencadenament del fenotip nuclear no apoptòtic succeeix de forma prematura en un procés de mort cel·lular que s'executa ràpidament.

## **6. Queleritrina provoca l'activació de les caspases i l'alliberament de factors pro-apoptogènics mitocondrials cap al citosol**

Per tal de determinar si la manca del fenotip apoptòtic en les cèl·lules tractades amb queleritrina es devia a un defecte en l'activació de les caspases, vam voler aprofundir sobre l'estat d'activació d'aquestes proteases.

L'anàlisi es realitzà mitjançant la tècnica de *Western Blot* a partir de la detecció del processament de les diferents caspases als seus respectius fragments actius. Com es mostra en la figura R8A, després de sotmetre les cèl·lules SH-SY5Y a un tractament amb queleritrina de 24 hores, aquestes van exhibir un processament de les caspases iniciadores, caspasa-2 i caspasa-9, en els seus corresponents fragments actius p18 per caspasa-2, i p37 i p35 pel cas de caspasa-9. Les caspases efectores (caspasa-3, -6 i -7) també es van proteolitzar durant el tractament amb queleritrina, generant els fragments actius p19 i p17 per caspasa-3, p15 per caspasa-6 i p20 per caspasa-7 (Figura R8B). A més, queleritrina també va induir el processament de diferents substractes específics de caspases tals com fodrina, proteolitzada al fragment p120 per caspasa-3, lamina C al fragment p37 per caspasa-6 i p23 al fragment p15 per caspasa-7 (Figura R8B). La detecció d'aquests fragments confirmà l'activació de les caspases efectores desencadenada per queleritrina. Cal remarcar que, en general, la proteòlisi detectada de les diferents caspases en el tractament amb queleritrina es caracteritzava per una baixada de les diferents pro-formes i detecció dels diferents fragments actius més forta que la mostrada per estaurosporina (Figures R8A i R8B). Caspasa-3 i caspasa-6, però, mostraven una detecció dels fragments actius similar a l'induïda per l'estaurosporina (Figures R8A i R8B). Per contra, caspasa-9 i caspasa-7, eren les caspases que presentaven tant una baixada de la pro-forma, com una detecció dels fragments actius més potent en les cèl·lules tractades amb queleritrina que en les d'estaurosporina (Figures R8A i R8B). Pel que fa a caspasa-2, aquesta també patia una disminució de la seva pro-forma en el tractament amb

queleritrina en comparació al control de les cèl·lules no tractades, però de forma similar a la d'estaurosporina (Figura R8A). En aquest cas, però, les cèl·lules tractades amb queleritrina mostraven una acumulació del fragment p32 (Figura R8A). Aquest fet suggeria l'existència d'un processament diferent d'aquesta caspasa respecte al que s'estava realitzant en el tractament amb l'estaurosporina.



**Figura R8.** Estudi de l'activació de caspases i de l'alliberament de factors mitocondrials pro-apoptogènics després de tractar les cèl·lules SH-SY5Y amb queleritrina. Les cèl·lules SH-SY5Y es van deixar sense tractar (-) o es tractaren (+) amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP durant 24h de tractament. Mitjançant la tècnica de *Western Blot* es determinà el processament de les caspases iniciadores (caspasa-2 i caspasa-9) (A), i el de les caspases executores (caspasa-3, caspasa-6 i caspasa-7) (B). (B) Posteriorment, s'analitzà l'activació de les caspases executores mitjançant un anàlisi de la proteòlisi de diferents substrates específics de caspases (fodrina per caspasa-3, lamina A/C per caspasa-6 i p23 per caspasa-7). (A i B) L'anàlisi de l'activació de caspases es va fer emprant 20  $\mu$ g d'extractes totals de proteïna i les membranes es tenyiren amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar la càrrega proteïca. (C) Per últim, s'extraí i analitzà també per *Western Blot* la fracció citoplasmàtica de les cèl·lules SH-SY5Y en les condicions esmentades de tractament de Che i STP. Posteriorment, es determinà la presència dels factors mitocondrials pro-apoptòtics citocrom C (Cytochrome C) i Smac (SMAC/DIABLO) en cada un dels diferents tractaments. La membrana es tení també amb NB per tal d'avaluar la càrrega proteïca.

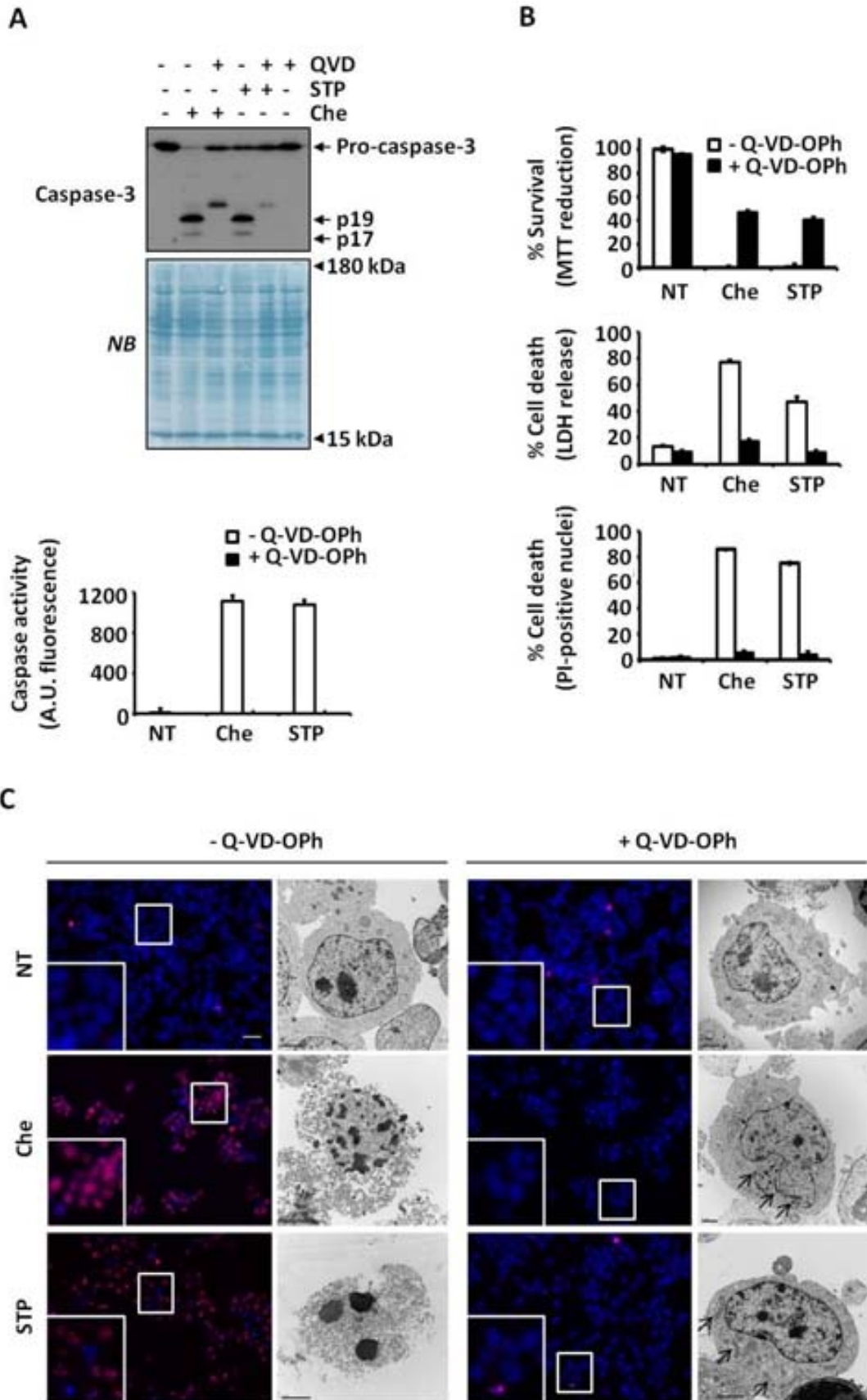
Per altra banda, vam analitzar la sortida dels factors mitocondrials pro-apoptogènics citocrom c, component clau en la constitució de l'apoptosoma (Li, Nijhawan et al. 1997), i Smac/DIABLO, el qual permet l'activació de les caspases a través de la inhibició de les IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*) (Du, Fang et al. 2000). Tots dos factors mitocondrials es van detectar a la fracció citoplasmàtica després de tractar les cèl·lules amb queleritrina (Figura R8C).

Inclús, la sortida mitocondrial d'aquests factors es produí de forma més intensa en les cèl·lules tractades amb aquest alcaloide que en les sotmeses a estaurosporina (Figura R8C).

## 7. La mort cel·lular induïda per queleritrina és dependent de l'activació de les caspases

D'acord amb els resultats obtinguts fins ara, la manca del fenotip apoptòtic desencadenat per queleritrina no es podia relacionar amb un defecte en l'activació de les caspases. El fet, però, que aquest alcaloide estigués induint un fenotip de mort no apoptòtic en les cèl·lules SH-SY5Y amb les caspases activades, ens suggerí que potser l'activació d'aquestes no era un esdeveniment determinant pel desencadenament de la mort cel·lular. Per aquesta raó, es va procedir a analitzar si el fenotip de mort induït per queleritrina era dependent de caspases. Per fer-ho, es dugué a terme un co-tractament de 24 hores en les cèl·lules SH-SY5Y amb l'inhibidor de caspases d'ampli espectre, Q-VD-OPh, i queleritrina. En paral·lel, es realitzà un altre co-tractament amb Q-VD-OPh i estaurosporina com a control positiu de l'acció efectiva de l'inhibidor de caspases.

En primer lloc, vam comprovar la inhibició de caspasa-3 per part de Q-VD-OPh mitjançant la tècnica de *Western Blot* i l'assaig d'activitat de caspasa DEVDasa (Figura R9A). Per una banda, les dades obtingudes van mostrar que l'activació de caspasa-3 s'inhibia en les dues condicions de co-tractament amb Q-VD-OPh, donat que en aquestes no es van detectar els fragments actius p19 i p17 (Figura R9A). Per altra banda, els valors d'activitat DEVDasa es van reduir totalment en les condicions en les quals l'inhibidor de caspases també era present al medi de cultiu (Figura R9A). Posteriorment, s'analitzà la mort cel·lular desencadenada per queleritrina en presència de l'inhibidor mitjançant els assajos de supervivència cel·lular MTT i dues tècniques de quantificació de mort cel·lular (Figura R9B). Aquestes darreres es van basar d'una banda, en la mesura de la LDH alliberada al medi extracel·lular i, de l'altra, en el recompte dels nuclis positius per la tinció amb PI respecte als totals tenyits amb Hoechst. Tots aquests assajos, van exhibir una reducció del percentatge de mort induït per queleritrina quan l'inhibidor de caspases també s'afegia al medi de cultiu (Figura R9B). Finalment, es realitzà un anàlisi morfològic en les mateixes condicions de co-tractament a partir tant d'imatges de fluorescència obtingudes en la doble tinció nuclear de PI i Hoechst, emprades en la quantificació de la mort cel·lular, com de les derivades d'un anàlisi de microscopia electrònica (Figura R9C). Tal i com s'observa en la figura R9C, la doble tinció de PI i Hoechst va permetre detectar que l'inhibidor de caspases era capaç d'evitar el fenotip nuclear no apoptòtic desencadenat per queleritrina, ja que no solament els nuclis analitzats eren negatius per la tinció de PI, sinó que el seu aspecte en el co-tractament era similar al manifestat en les cèl·lules sense tractar. Pel que fa a l'anàlisi de microscopia electrònica, aquest també va mostrar una protecció de l'acció de queleritrina en el fenotip de les cèl·lules co-tractades amb Q-VD-OPh (Figura R9C). No obstant, tot i que l'inhibidor de caspases va impedir la manifestació del fenotip nuclear no apoptòtic en les cèl·lules tractades amb queleritrina, la protecció del citoplasma no es realitzà de forma completa (Figura R9C). En concret, es detectà un estat de condensació i reducció del tamany de les mitocòndries en les condicions de co-tractament amb queleritrina i Q-VD-OPh (indicat per fletxes en la figura R9C). Per tant, el conjunt de tots aquests resultats suggereixen que tant el procés de mort cel·lular com el fenotip nuclear no apoptòtic desencadenat per queleritrina, requereixen de l'activació de les caspases.



**Figura R9.** El fenotip de mort induït per queleritrina es produeix de forma dependent de caspases. Les cèl·lules SH-SY5Y es van deixar sense tractar (indicades com a NT o (-)) o es tractaren (+) amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP o bé, es co-tractaren (+) amb l'inhibidor de caspases Q-VD-OPh (QVD) a la dosi de 20  $\mu$ M i 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP

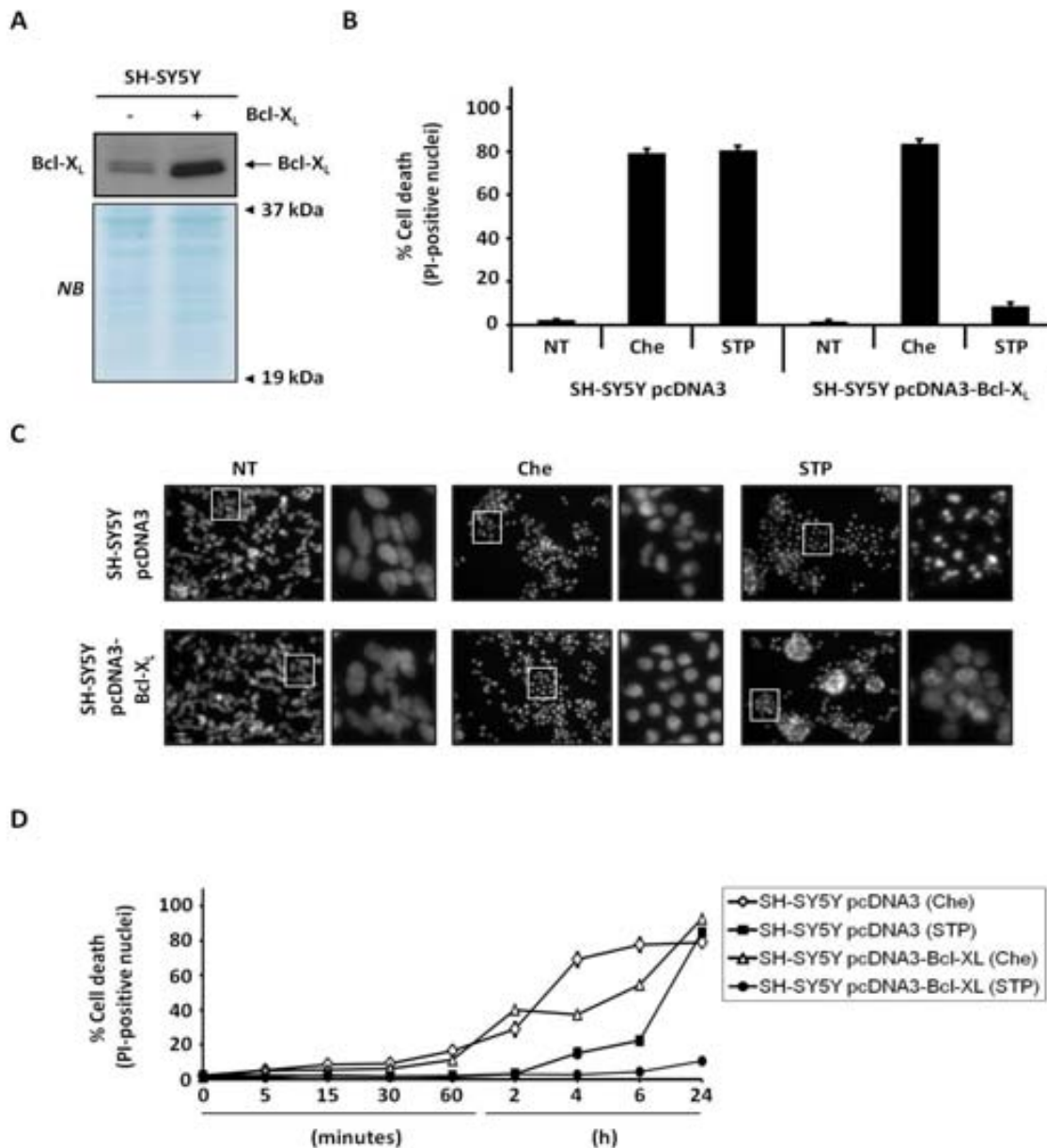


durant 24h de tractament. **(A)** Al panell superior, s'obtingueren 50 µg d'extractes total de proteïna per analitzar el processament de caspasa-3 als seus fragments actius mitjançant la tècnica de *Western Blot*. La membrana emprada es tenyí amb NB (*naphthol blue*) per tal de comprovar la càrrega equitativa de les proteïnes. Al panell inferior, es determinà l'activitat de caspases a través de l'assaig DEVDasa mitjançant la incubació de 20 µg de proteïna amb el substrate fluorogènic Ac-DEVD-afc durant 12h en el fluorímetre. Els resultats d'activitat es van adquirir com a unitats arbitràries de fluorescència (A.U. *fluorescence*). **(B)** A continuació, es determinà la viabilitat cel·lular utilitzant l'assaig de supervivència MTT (panell superior), i els assajos de mort cel·lular d'alliberament extracel·lular de LDH (panell del mig) i de recompte de nuclis positius per PI respecte als totals tenyits amb Hoechst 33342 (panell inferior). Les barres blanques representen el tractament de les cèl·lules en absència de Q-VD-Oph, i les negres el co-tractament amb l'inhibidor de caspases **(A i B)**. **(C)** Als panells laterals de la banda esquerra es mostra l'anàlisi de la morfologia nuclear a través de la doble tinció nuclear de Hoechst 33342 i PI emprada en el recompte de nuclis positius per PI mostrat en (B). Les cèl·lules emmarcades s'exhibeixen en magnificacions més grans en la part inferior esquerra de les imatges de fluorescència. La barra blanca indica 50 µm. En els panells laterals de la banda dreta, es mostra l'anàlisi morfològic en les mateixes condicions de tractament, però amb imatges de microscopia electrònica. En les condicions de co-tractament de queleritrina i Q-VD-Oph, les fletxes indiquen una condensació i reducció del tamany de les mitocondries, mentres que en el co-tractament d'estaurosporina i l'inhibidor de caspases, assenyalen un estat inalterat de les mateixes. L'escala utilitzada s'indica en cada una de les corresponents imatges.

## 8. Queleritrina és capaç d'induir mort cel·lular en cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores de la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub>

Tenint en compte que el fenotip de mort provocat per queleritrina es podia evitar mitjançant la inhibició de les caspases i que aquest alcaloide inhibia la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub> (Chan, Lee et al. 2003), vam voler determinar si el procés de mort també es podia impedir, però, a través d'un increment dels nivells d'expressió de Bcl-X<sub>L</sub>.

Primerament, mitjançant la tècnica de *Western Blot* es comprovà la sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica en cèl·lules SH-SY5Y amb Bcl-X<sub>L</sub> transfectat de forma estable (SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub>) en comparació a les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb el plàsmid pcDNA3 buit (SH-SY5Y pcDNA3), totes dues línies cel·lulars provinents del nostre laboratori (Figura R10A). Posteriorment, es procedí a analitzar en aquestes cèl·lules tant la mort cel·lular com la morfologia nuclear induïdes per queleritrina a 24 hores de tractament (Figures R10B i R10C). El gràfic de quantificació de mort cel·lular realitzat a través del recompte de nuclis positius per la tinció del PI respecte als totals tenyits amb Hoechst, revelà una resistència de la mort apoptòtica desencadenada per estaurosporina en les cèl·lules sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub> (Figura R10B). En canvi, aquest anàlisi mostrà una sensibilització a la mort induïda per queleritrina en aquestes cèl·lules i de forma similar a l'obtinguda en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit (Figura R10B). A més, les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub> que morien després de tractar-se amb queleritrina van manifestar un fenotip nuclear similar al detectat en el tractament d'aquest alcaloide en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 (Figura R10C). Per contra, les cèl·lules sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub>, resistents a la mort induïda per estaurosporina, no van manifestar la morfologia apoptòtica clàssica provocada per aquest alcaloide, la qual es va mostrar en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit (Figura R10C).



**Figura R10.** L'increment d'expressió dels nivells de Bcl-X<sub>L</sub> no pot evitar la mort induïda per queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y. Les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 i SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub> es van deixar sense tractar (NT) o es tractaren amb 10 μM de Che o 1 μM de STP durant 24h de tractament. **(A)** 20 μg d'extractes totals de proteïna s'obtingueren per l'anàlisi de la sobreexpressió de Bcl-X<sub>L</sub> mitjançant la tècnica de *Western Blot*. Les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb Bcl-X<sub>L</sub> (SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub>) o el plàsmid buit (SH-SY5Y pcDNA3) s'indiquen com a (-) o (+) respectivament. La membrana emprada es va tindre amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(B)** Posteriorment, es quantificà la mort cel·lular en cada un dels tractaments esmentats mitjançant el recompte de nuclis positius per PI respecte als totals tenyits per Hoechst 33342. **(C)** A continuació, s'analitzà la morfologia nuclear a partir de la tinció de Hoechst emprada en (B). Les cèl·lules enquadrades es mostren en les magnificacions situades al lateral de cada imatge. L'escala equival a 50 μm. **(D)** Determinació del perfil de mort cel·lular induït per Che o STP al llarg d'un curs temporal mitjançant el recompte de nuclis positius per PI respecte als totals tenyits per Hoechst 33342. El tractament de Che en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 i SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub> es mostra amb rombes i triangles blancs respectivament. Pel que fa al tractament de STP, aquest s'indica amb quadrats negres per les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 i rodones negres en el cas de les SH-SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub>.

No obstant, amb l'objectiu de corroborar els resultats obtinguts en aquestes cèl·lules, es dugué a terme un anàlisi temporal del perfil de mort induït per queleritrina en temps de tractament anteriors a les 24 hores (Figura R10D). Tal i com s'observa en la figura R10D, les cèl·lules SH-

SY5Y pcDNA3-Bcl-X<sub>L</sub> van mostrar percentatges de mort similars als obtinguts en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit fins a les 2 hores de tractament amb queleritrina. A més, cal remarcar que els percentatges de mort detectats durant els primers temps de tractament amb queleritrina eren semblants als observats en les cèl·lules SH-SY5Y wt (*wild type*) (comparar figures R7A i R10D). No obstant, l'increment d'expressió de la proteïna antiapoptòtica va permetre reduir els nivells de mort cel·lular desencadenats per queleritrina en els temps de tractament de 4 i 6 hores (Figura R10D). Tot i així, a les 24 hores aquest efecte de protecció s'acabà perdent, ja que en aquest darrer temps s'assoliren nivells de mort similars als detectats en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit (Figura R10D). Per altra banda, el perfil de mort mostrat en els temps de tractament en els quals es detectà aquest efecte de protecció recordava a l'obtingut en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 tractades amb estaurosporina, on l'increment dels percentatges de mort s'assolia de forma més gradual i progressiva (Figura R10D). Cal remarcar, a més, que la sobreexpressió de Bcl-X<sub>L</sub> va reduir en tot moment els nivells de mort provocats per l'estaurosporina (Figura R10D).

En qualsevol cas, el conjunt de resultats analitzats ens permet valorar que queleritrina és capaç d'induir un procés de mort cel·lular en les cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub>, malgrat l'increment d'expressió de la proteïna antiapoptòtica redueixi en determinats temps de tractament els percentatges de mort induïts per aquest alcaloide.

## 9. Queleritrina indueix una activació prematura de les caspases

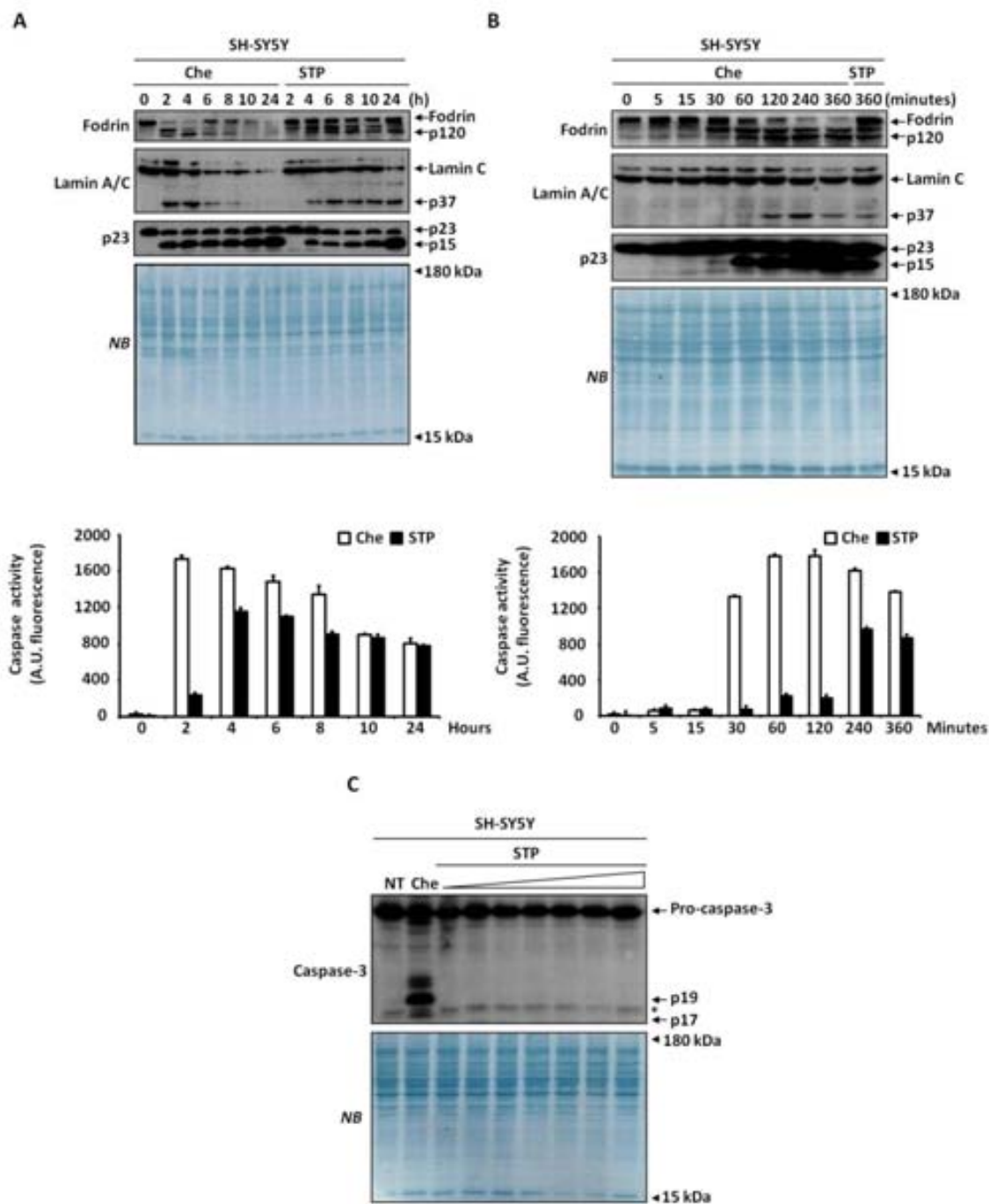
Els resultats analitzats fins ara indiquen que l'activació de caspases és l'esdeveniment bioquímic més determinant per la inducció del fenotip de mort no apoptòtic provocat per queleritrina. És per això, que es va procedir a analitzar de forma més específica l'activació d'aquestes al llarg de diferents temps de tractament amb l'alcaloide i de forma comparativa amb l'estaurosporina. D'aquesta manera, es pretenia descartar de forma definitiva un defecte en el procés d'activació d'aquestes proteases que pogués explicar la manca del fenotip apoptòtic desencadenada pel nostre compost.

L'estudi temporal d'activació de les caspases es realitzà mitjançant la tècnica de *Western Blot* i l'assaig d'activitat de caspases DEVDasa. Tal i com s'observa en la figura R11A, els diferents substractes específics de caspases (fodrina, lamina C i p-23) es van proteolitzar en els seus respectius fragments (p120 per fodrina, p37 per lamina C i p15 en el cas de p23) a partir de les 2 hores de tractament amb queleritrina. Cal remarcar, que la intensitat d'aquesta detecció disminuï a partir de les 6 hores, almenys en el cas de fodrina i lamina C (Figura R11A). En aquest sentit, es podria pensar que l'activació de les caspases es podria estar reduint a partir d'aquest temps de tractament amb queleritrina. No obstant, l'assaig DEVDasa va mostrar nivells d'activitat de caspasa en el tractament amb queleritrina més elevats que amb el d'estaurosporina fins a les 8 hores de tractament (Figura R11A). Els valors d'activitat de caspasa induïts en els tractaments dels dos estímuls citotòxics només van ser similars en els darrers punts temporals de 10 i 24 hores de tractament (Figura R11A). Per contra, l'estaurosporina desencadenà el processament dels diferents substractes de caspases a partir de les 4 hores de tractament, sense disminuir la intensitat de detecció dels fragments proteolitzats per cada substrate (Figura R11A). En concordança, l'increment dels nivells d'activitat de caspases induïts per l'estaurosporina també es va detectar en aquest mateix temps de tractament (Figura R11A). Per tant, queleritrina estava induint nivells d'activitat de caspases de forma més potent i anticipada que estaurosporina. Tot i així, els perfils d'activitat DEVDasa adquirits eren similars, ja que els dos estímuls citotòxics mostraven una

disminució gradual i progressiva dels valors d'activitat de caspasa després d'assolir els nivells màxims en cada cas (Figura R11A).

D'acord amb la detecció prematura del fenotip nuclear no apoptòtic provocat per queleritrina, es va realitzar un estudi temporal de l'activació de caspases tenint en compte els temps de tractament de l'alcaloide amb els quals s'havia arribat a manifestar aquest fenotip de mort (Figura R7B). En aquest cas, l'anàlisi temporal d'activació de caspases realitzat mitjançant la tècnica de *Western Blot* revelà l'inici del processament dels diferents substractes a partir d'una hora de tractament amb queleritrina (Figura R11B). Tot i així, a la mitja hora ja s'intuïen els respectius fragments proteolitzats dels diferents substractes (Figura R11B). Aquests resultats es correlacionaven amb la detecció temporal del fenotip no apoptòtic provocat per queleritrina (Figura R7B). Per altra banda, cal remarcar que el fragment de la lamina C no es mostrà fins a les 2 hores de tractament amb queleritrina (Figura R11B). Aquest fet podria arribar a explicar el manteniment de la coberta nuclear detectat a una hora de tractament amb aquest alcaloide (Figura R7C) i la manca del fenotip apoptòtic en els temps de tractament anteriors a les 2 hores (Figures R6A i R7B), si tenim en compte la implicació descrita de les lamines nuclears tant en els canvis estructurals apoptòtics del nucli com en la fragmentació de l'ADN i condensació de la cromatina (Rao, Perez et al. 1996).

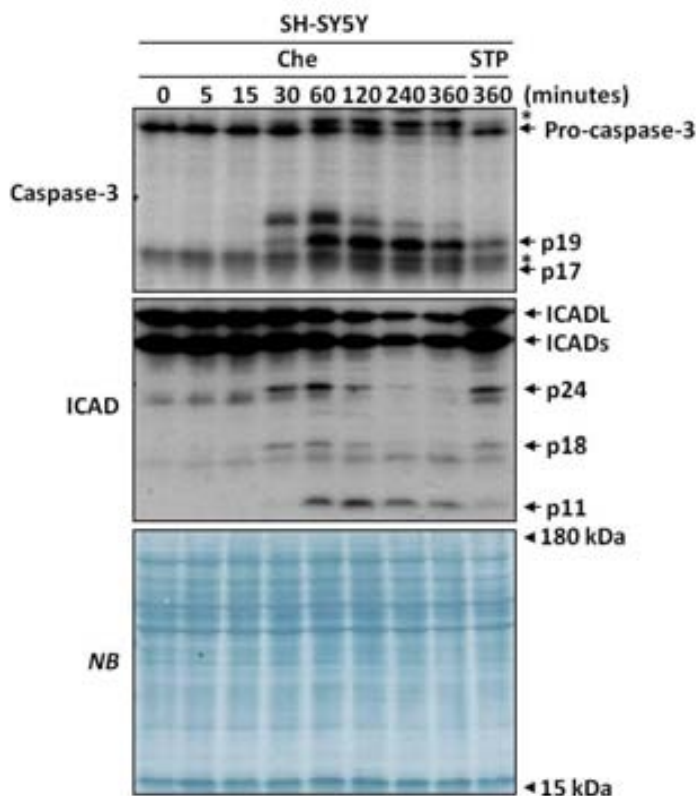
Posteriorment, es realitzà un assaig DEVDasa emprant els mateixos temps de tractament que els utilitzats en l'últim anàlisi de *Western Blot*, però determinant els valors d'activitat de caspasa per cada un d'aquests temps, tant pel tractament amb queleritrina com pel d'estaurosporina (Figura R11B). D'aquesta manera, es pretenia valorar si l'activació prematura de caspases detectada en el tractament amb queleritrina es podia considerar un esdeveniment específic del procés de mort induït per aquest alcaloide. D'acord amb els resultats obtinguts en el darrer anàlisi temporal fet per *Western Blot*, l'assaig DEVDasa confirmà l'inici d'activació de les caspases a la mitja hora de tractament amb queleritrina (Figura R11B). A més, aquest darrer assaig també indicà que les cèl·lules tractades amb queleritrina assolien els nivells màxims d'activació de caspases durant la primera i segona hora de tractament (Figura R11B). En canvi, els nivells d'activitat de caspases van ser mínims durant els primers temps de tractament amb estaurosporina (Figura R11B). Per tant, es podia establir que l'activació anticipada de les caspases era un esdeveniment específic del procés de mort cel·lular desencadenat per queleritrina. Inclús, aquesta activació primerenca de caspases no es va detectar ni quan les cèl·lules SH-SY5Y eren exposades a una hora de tractament amb concentracions d'estaurosporina més elevades (Figura R11C). Per tant, aquest darrer fet suggeria que el desencadenament d'aquest tipus d'activació era independent de la concentració emprada de l'estímul citotòxic.



## 10. ICAD és processat correctament després del tractament amb queleritrina

Tal i com s'ha especificat en la introducció, el sistema principal descrit implicat tant en la inducció de la morfologia apoptòtica com en la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN és el sistema ICAD·CAD (veure apartat 4.2. "Endonucleases implicades en la fragmentació de l'ADN"). De forma basal, CAD es troba acomplexada amb ICAD, la qual actua com a inhibidor de l'endonucleasa (Sabol, Li et al. 1998). Quan les cèl·lules es sotmeten a un estímul apoptòtic, el processament d'ICAD, mitjançant l'acció de la caspasa-3, permet l'alliberament de l'endonucleasa per dur a terme la fragmentació apoptòtica de l'ADN (Liu, Zou et al. 1997; Sabol, Li et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998). Tenint en compte que els nostres resultats mostraven que la manifestació del fenotip de mort provocat per queleritrina era dependent de caspases, vam voler analitzar la implicació del sistema ICAD·CAD en el procés de mort induït per aquest alcaloide.

D'entrada, ens vam centrar en realitzar un anàlisi temporal de l'activació de caspasa-3 i del processament d'ICAD mitjançant la tècnica de *Western Blot* (Figura R12). D'aquesta manera, es pretenia descartar un defecte en la proteòlisi d'algun d'aquests components que pogués justificar l'absència del fenotip apoptòtic en el tractament amb queleritrina. Tal i com s'observa en la figura R12, el processament tant de la caspasa-3 com d'ICAD es van produir de forma sincronitzada. Als 30 minuts de tractament amb queleritrina es detectaren el fragment actiu p19 de caspasa-3 i els fragments C-terminal p24 i p18 provinents de la proteòlisi en els residus d'àcid aspàrtic (Asp) Asp117 d'ICAD-L (isoforma llarga d'ICAD) i d'ICAD-S (isoforma curta d'ICAD) respectivament (Figura R12). Aquesta sincronització es realçà amb la detecció a una hora de tractament, tant del fragment actiu p17 de la caspasa-3 com del fragment C-terminal p11 d'ICAD-L, el qual prové del segon tall proteolític realitzat per caspasa-3 en el residu Asp224 de la isoforma llarga (Figura R12). A més, aquests resultats concordaven amb l'activació primerenca de les caspases detectada en els anteriors estudis temporals (comparar figures R11B i R12). Cal remarcar que l'escisió proteolítica dels dos components es realitzà de forma correcta al llarg de tot el tractament amb queleritrina, ja que es detectaren tots els fragments derivats del processament complet d'aquestes dues proteïnes (p19 i p17 en el cas de caspasa-3; i p24, p18 i p11 en el cas d'ICAD) (Figura R12). Per altra banda, cal afegir que la detecció del fragment C-terminal p11 va ser més intensa en les cèl·lules tractades amb queleritrina que en les sotmeses a estaurosporina (Figura R12). A més a més, la detecció d'aquest fragment es va mantenir al llarg de tots els temps de tractament amb queleritrina (Figura R12). Aquest darrer fet resulta especialment rellevant si es té en compte que la detecció d'aquest fragment s'associa amb l'alliberament de CAD i la inducció del fenotip apoptòtic (Tang and Kidd 1998).



**Figura R12.** Anàlisi de l'activació de caspasa-3 i del processament d'ICAD al llarg d'una cinètica temporal de tractament amb queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y. Les cèl·lules SH-SY5Y es van tractar amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP al llarg dels diferents temps de tractament indicats. Es carregaren 20  $\mu$ g d'extractes totals de proteïna per l'anàlisi per *Western Blot* de l'activació de caspasa-3 i ICAD. Les bandes corresponents al processament dels seus respectius fragments es mostren a la banda dreta dels panells. L'asterisc ubicat per sobre de pro-caspasa-3 indica la presència d'una banda provinent d'un altre blot, mentre que el segon asterisc situat per sota del p19, indica la presència d'una banda inespecífica. La membrana es tenyí amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes.

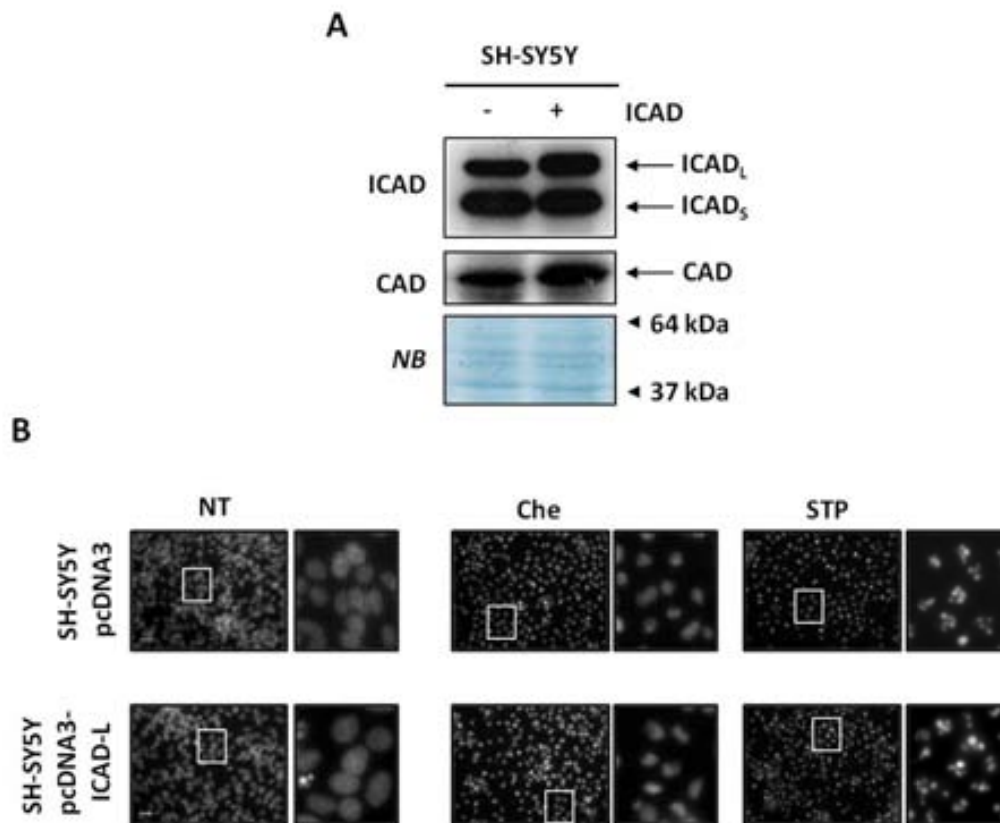
### 11. La sobreexpressió d'ICAD-L no permet recuperar la morfologia nuclear apoptòtica després del tractament amb queleritrina

D'acord amb l'anàlisi realitzat fins ara d'ICAD, els resultats indiquen que el seu processament s'estava realitzant correctament malgrat s'estigués proteolitzant de forma anticipada durant el tractament amb queleritrina. Tot i així, ens vam plantejar la possibilitat que CAD no s'estigués alliberant correctament d'ICAD degut al ràpid processament d'aquesta. A més, cal tenir en compte que ICAD no solament actua com a inhibidor de CAD, sinó que exerceix de xaperona de l'endonucleasa per tal de garantir el seu correcte plegament i expressió funcional (Halenbeck, MacDonald et al. 1998). ICAD-L és la isoforma principalment associada a la funció xaperona de l'endonucleasa (Nagase, Fukuyama et al. 2003; Gu, Dong et al. 1999; Sakahira, Enari et al. 1999), pel que es va creure convenient incrementar el nivells d'expressió d'aquesta isoforma en les cèl·lules SH-SY5Y.

En primer lloc, s'analizaren els nivells d'expressió d'ICAD en les cèl·lules sobreexpressores d'ICAD-L (SH-SY5Y pcDNA3-ICAD-L) respecte a les cèl·lules control transfectades amb el plàsmid buit (SH-SY5Y pcDNA3) mitjançant la tècnica de *Western Blot* (Figura R13A). Tal i com s'observa en la figura R13A, l'increment d'expressió d'ICAD-L detectat en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3-ICAD-L també va permetre augmentar els nivells d'expressió

de CAD degut a la funció xaperona d'ICAD-L (Nagase, Fukuyama et al. 2003; Gu, Dong et al. 1999; Sakahira, Enari et al. 1999). Posteriorment, es realitzà un anàlisi de la morfologia nuclear induïda en aquestes cèl·lules, després de ser tractades amb queleritrina durant 24 hores (Figura R13B). L'anàlisi morfològic revelà un aspecte de ls nuclis similar a l de tectat en l es cè l·lules transfectades amb el plàsmid buit, després de sotmetre totes dues línies cel·lulars al tractament amb queleritrina. A més, el fenotip nuclear visualitzat en cada un dels casos coincidia amb la morfologia nuclear no apoptòtica detectada en cèl·lules SH-SY5Y wt (comparar figures R13B i R5A). Pel que fa a estaurosporina, la sobreexpressió d'ICAD no va al terar la manifestació de la morfologia apoptòtica clàssica, la qual es mostrà de forma similar tant en les cèl·lules sobreexpressores d'ICAD-L com en les transfectades amb el plàsmid buit (Figura R13B). Aquest fet es correlacionava amb resultats previs publicats en els què es van emprar aquestes mateixes cèl·lules (Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005).

Tot plegat indica que l'increment d'expressió dels nivells d'ICAD-L no és determinant per assolir la recuperació del fenotip nuclear apoptòtic durant el procés de mort induït per queleritrina.



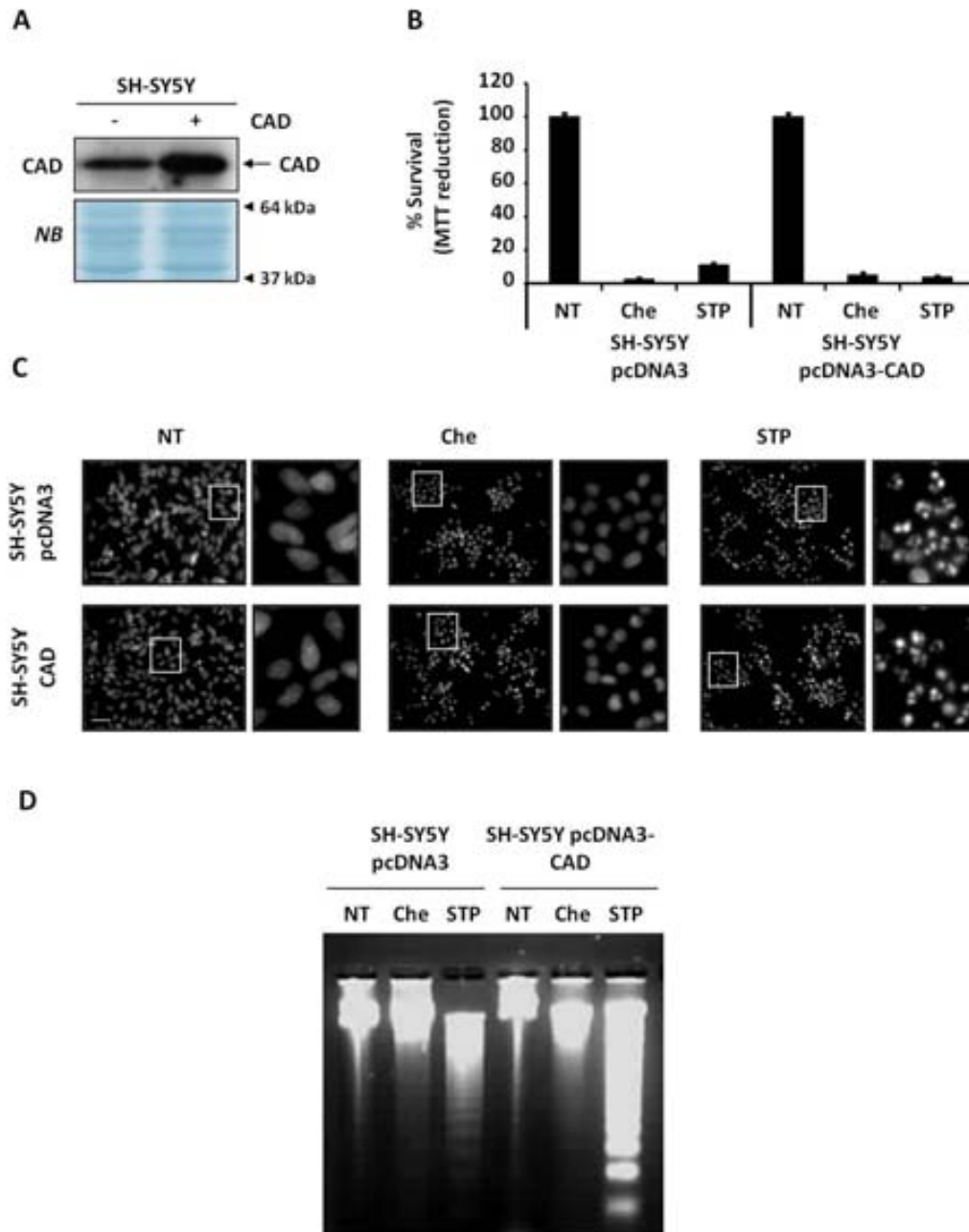
**Figura R13. Anàlisi de la morfologia nuclear en les cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores d'ICAD-L després del tractament amb queleritrina. (A)** Determinació mitjançant la tècnica de *Western Blot* dels nivells d'expressió d'ICAD (panell superior) i CAD (panell inferior) en les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb el plàsmid buit (SH-SY5Y pcDNA3) i en les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb ICAD (SH-SY5Y pcDNA3-ICAD-L) indicades com a (-) o (+) respectivament. Tant per l'anàlisi dels nivells d'expressió d'ICAD com pels de CAD, s'empraren 20 μg d'extractes totals de proteïna. La membrana utilitzada es tení amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(B)** Imatges representatives de morfologia nuclear de les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 i SH-SY5Y pcDNA3-ICAD-L després de deixar-se sense tractar (NT) o tractar-se amb 10 μM de Che o 1 μM de STP durant 24h de tractament. Les cèl·lules emmarcades s'exhibeixen en magnificacions més grans ubicades al lateral de cada una de les imatges. La barra blanca indica una escala de 50 μm.



## 12. La sobreexpressió de l'endonucleasa CAD no restableix el fenotip apoptòtic després del tractament amb queleritrina

Posteriorment als anàlisis realitzats tant de caspasa-3 com d'ICAD en el procés de mort desencadenat per queleritrina, ens vam centrar en estudiar la implicació de CAD en la inducció del fenotip no apoptòtic provocat per aquest alcaloide. D'entrada, ens vam plantejar forçar l'expressió de CAD en les cèl·lules SH-SY5Y amb el propòsit de determinar si aquest procés de mort requeria de forma específica expressar una major quantitat de l'endonucleasa per tal de manifestar un fenotip apoptòtic. Per aquesta raó, es procedí a analitzar la presència tant de la morfologia apoptòtica com de la degradació oligonucleosomal de l'ADN en cèl·lules provinents del laboratori sobreexpressores de CAD (SH-SY5Y pcDNA3-CAD), després de ser tractades amb queleritrina durant 24 hores (Figura R14).

D'entrada, tal i com indica la figura R14A, l'anàlisi realitzat per *Western Blot* mostrà un increment dels nivells d'expressió de CAD en les cèl·lules sobreexpressores d'aquesta, respecte a les del seu control de transfecció. Per altra banda, l'expressió forçada de CAD no alterà el procés de mort induït, donat que l'assaig de viabilitat cel·lular MTT indicava una reducció dels nivells de supervivència similars en les dues línies cel·lulars (SH-SY5Y pcDNA3-CAD i SH-SY5Y pcDNA3), tant en el tractament amb queleritrina com en el d'estaurosporina (Figura R14B). Pel que fa a l'anàlisi morfològic, l'increment d'expressió dels nivells de CAD no va restablir la morfologia apoptòtica en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3-CAD sotmeses al tractament amb queleritrina, ja que l'aspecte dels nuclis era similar al manifestat per les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 (Figura R14C). De la mateixa manera, l'expressió forçada de CAD tampoc va permetre induir la degradació oligonucleosomal de l'ADN en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3-CAD tractades amb queleritrina, ja que l'anàlisi electroforètic de l'ADN tan sols va exhibir la fragmentació LMW en les cèl·lules exposades al tractament d'estaurosporina (Figura R14D). Per últim, cal remarcar que l'increment dels nivells d'expressió de CAD no va alterar la morfologia apoptòtica induïda per estaurosporina (Figura R14C). En canvi, la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN era més marcada en les SH-SY5Y pcDNA3-CAD que la manifestada en les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 (Figura R14D).



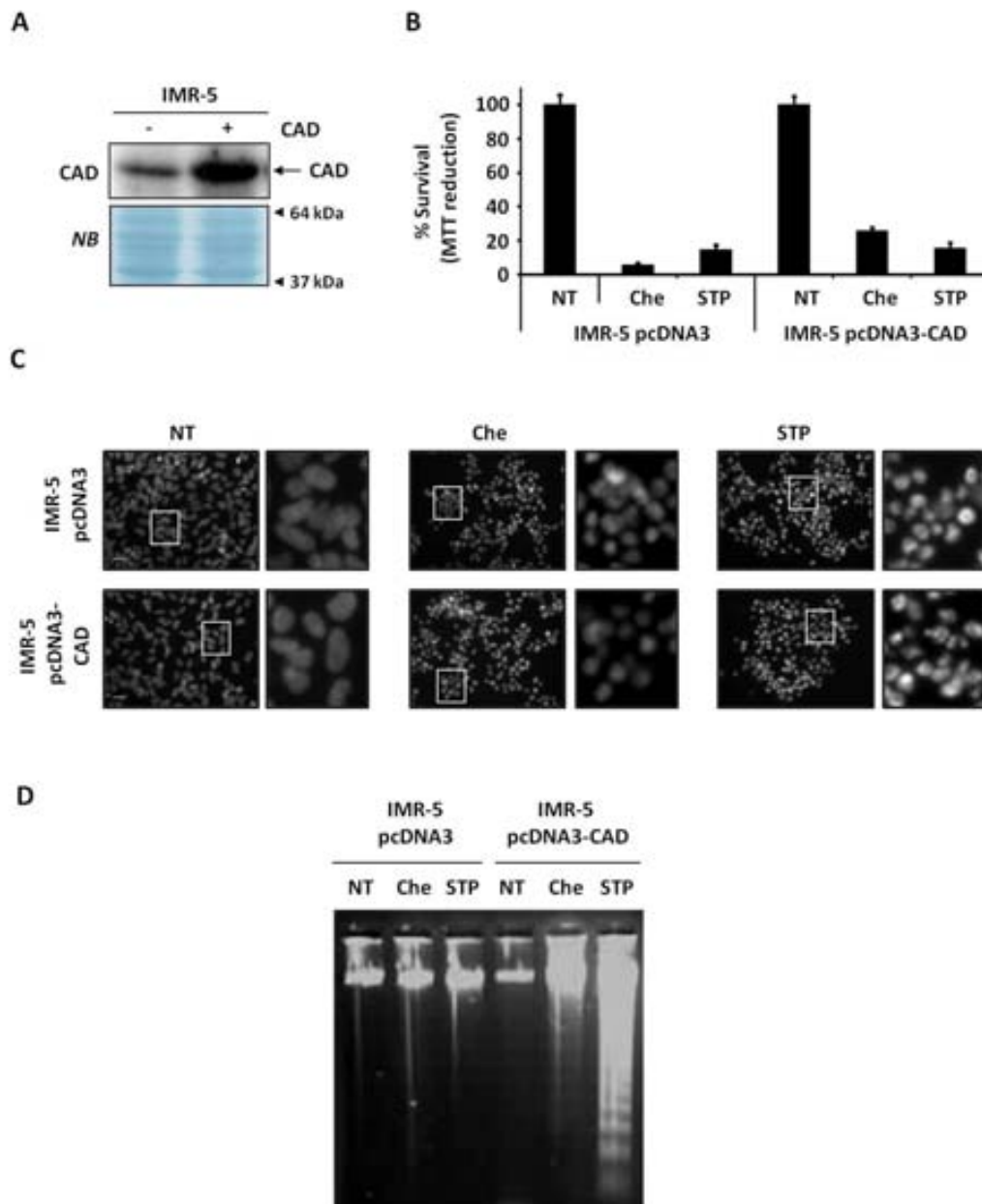
**Figura R14.** La sobreexpressió de CAD en les cèl·lules SH-SY5Y no permet recuperar el fenotip nuclear apoptòtic després del tractament amb queleritrina. **(A)** Determinació dels nivells d'expressió de CAD mitjançant la tècnica de *Western Blot* en les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb el plàsmid buit (SH-SY5Y pcDNA3) o amb CAD (SH-SY5Y pcDNA3-CAD) indicades respectivament com a (-) o (+). La membrana emprada es tení amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(B, C i D)** Les cèl·lules SH-SY5Y pcDNA3 i SH-SY5Y pcDNA3-CAD es van deixar sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP durant 24h. **(B)** Posteriorment, es quantificà la mort cel·lular obtinguda en aquests tractaments mitjançant el recompte de nuclis postius per la tinció amb PI respecte els totals tenyits amb Hoechst 33342. **(C)** A continuació, s'analitzà la morfologia nuclear mitjançant la tinció nuclear de Hoechst emprada en (B). Les cèl·lules enquadrades es mostren en magnificacions visualitzades al lateral de les imatges i l'escala equival a 50  $\mu$ m. **(D)** Finalment, es realitzà un anàlisi electroforètic de la degradació olugonucleosomal de l'ADN a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi.

### **13. La sobreexpressió de CAD en cèl·lules IMR-5 tampoc és capaç de recuperar la morfologia nuclear apoptòtica ni la degradació oligonucleosomal de l'ADN després de sotmetre les cèl·lules a l'insult citotòxic de queleritrina**

L'increment en els nivells d'expressió de CAD en cèl·lules SH-SY5Y no permetia restablir el fenotip de mort apoptòtic després de tractar les cèl·lules amb queleritrina. Aquests resultats ens indicaven que la manca del fenotip apoptòtic no es devia a un requeriment específic d'expressar una major quantitat de CAD. Amb el propòsit de descartar definitivament aquest fet vam decidir utilitzar les cèl·lules IMR-5, les quals també manifestaven un fenotip de mort no apoptòtic després de tractar-se amb queleritrina (Figura R3). Aquestes cèl·lules després de ser sotmeses a un tractament amb estaurosporina, també es caracteritzen per no manifestar ni la morfologia apoptòtica tipus II ni la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (Yuste, Bayascas et al. 2001). En aquest cas, però, la sobreexpressió de CAD sí que permet recuperar el fenotip apoptòtic (Yuste, Bayascas et al. 2001). És per això, que es procedí a analitzar tant la morfologia nuclear com la degradació oligonucleosomal de l'ADN en cèl·lules IMR-5 sobreexpressores de CAD (IMR-5 pcDNA3-CAD) en comparació a les cèl·lules IMR-5 transfectades amb el plàsmid buit (IMR-5 pcDNA3), després de tractar totes dues línies cel·lulars amb queleritrina durant 24 hores.

D'entrada, es comprovà la sobreexpressió dels nivells de CAD mitjançant la tècnica de *Western Blot* en les cèl·lules IMR-5 pcDNA3-CAD respecte a les cèl·lules IMR-5 pcDNA3 (Figura R15A). Posteriorment, s'analitzà la mort induïda per queleritrina en aquestes cèl·lules a través de l'assaig de supervivència MTT (Figura R15B). Tal i com s'observa en la figura R15B, queleritrina induïda un efecte tòxic en les cèl·lules IMR-5 sobreexpressores de CAD mostrant, però, una toxicitat menor que la manifestada en les cèl·lules IMR-5-pcDNA3 després de ser tractades amb aquest alcaloide. Pel que fa a l'anàlisi morfològic, les cèl·lules IMR-5 pcDNA3-CAD tractades amb queleritrina van mostrar una morfologia nuclear no apoptòtica similar a la detectada en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit (Figura R15C). A la vegada, les cèl·lules IMR-5 sobreexpressores de CAD eren incapaces de manifestar la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN després de ser tractades amb aquest alcaloide (Figura R15D). Per contra, la sobreexpressió de CAD va restablir la morfologia apoptòtica tipus II i la degradació LMW de l'ADN en les cèl·lules IMR-5 pcDNA3-CAD tractades amb estaurosporina (Figures R15C i R15D). Per últim, cal esmentar que les cèl·lules IMR5-pcDNA3 tractades amb estaurosporina, a diferència de les sotmeses a queleritrina, mostraven una morfologia nuclear apoptòtica de tipus I caracteritzada per una condensació marginal de la cromatina (Figura R15C).

En conjunt, tots els resultats suggereixen que el fenotip de mort no apoptòtic provocat per queleritrina no es deu definitivament a una manca de nivells de CAD. Aquest fet ens plantejà centrar-nos en l'estudi de CAD endògena durant el procés de mort desencadenat per aquest alcaloide.



**Figura R15.** Les cèl·lules IMR-5 sobreexpressores de CAD no manifesten un fenotip de mort apoptòtic després de ser tractades amb queleritrina. **(A)** Determinació dels nivells d'expressió de CAD mitjançant la tècnica de *Western Blot* en les cèl·lules IMR-5 transfectades amb el plàsmid buit (IMR-5 pcDNA3) o amb CAD (IMR-5 pcDNA3-CAD) indicades respectivament com a (-) o (+). La membrana emprada es tenyí amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(B, C i D)** Les cèl·lules IMR-5 pcDNA3 i IMR-5 pcDNA3-CAD es van deixar sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP durant 24h. **(B)** Posteriorment, es quantificà la mort cel·lular obtinguda en aquests tractaments mitjançant el recompte de nuclis postius per la tinció de PI respecte als totals tenyits per Hoechst 33342. **(C)** A continuació, s'analitzà la morfologia nuclear mitjançant la tinció nuclear de Hoechst emprada en (B). Les cèl·lules enquadrades es mostren en magnificacions visualitzades al lateral de les imatges. L'escala equival a 50  $\mu$ m. **(D)** Finalment, es realitzà un anàlisi electroforètic de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi.

#### 14. Els nivells d'expressió de CAD no es veuen alterats durant el tractament amb queleritrina

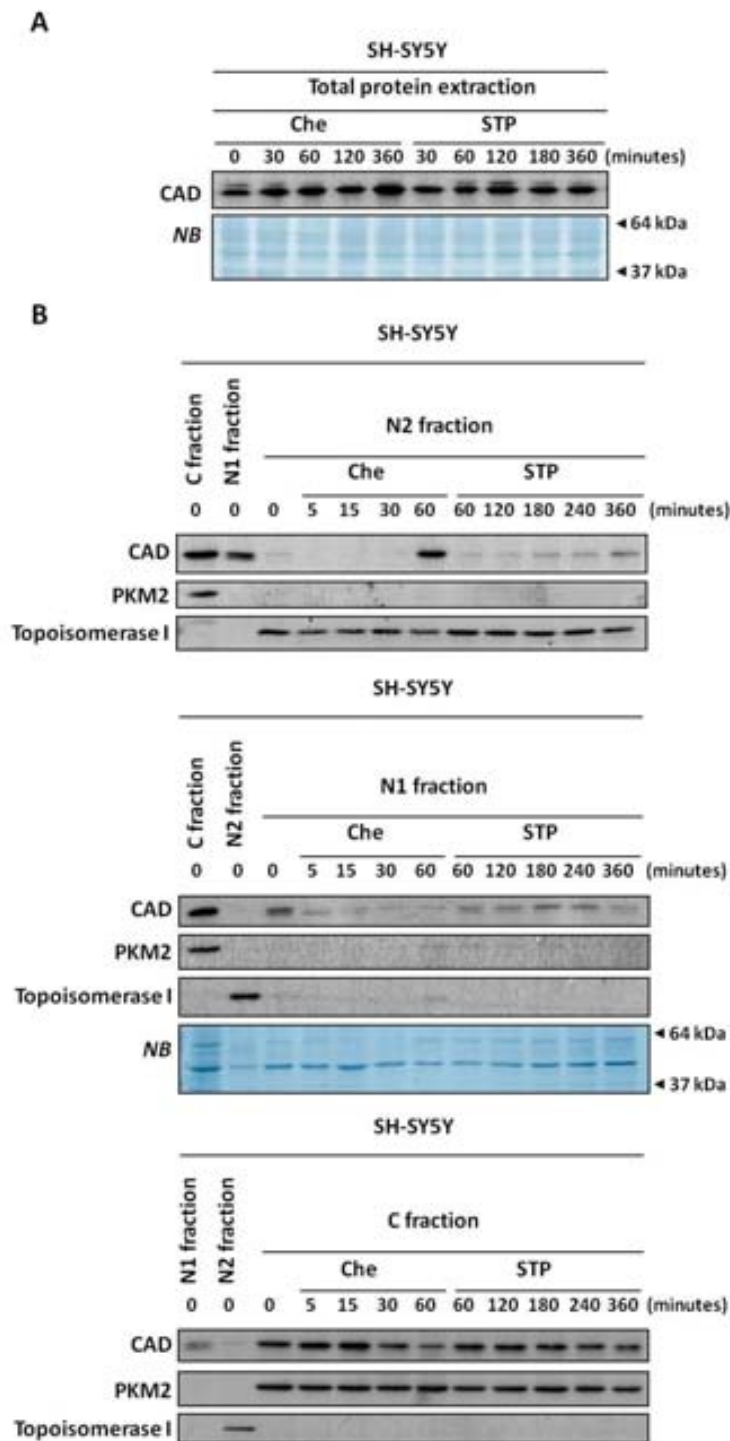
Per tal de procedir a l'estudi de CAD endògena en el procés de mort induït per queleritrina, primerament s'analitzaren els nivells de l'endonucleasa procedents d'extractes totals de proteïna durant diferents temps de tractament amb aquest alcaloide. Aquest anàlisi es realitzà de forma comparativa amb els nivells detectats al llarg d'un curs temporal de tractament amb estaurosporina. Tal i com s'observa en la figura R16A, els nivells totals de CAD es van detectar de forma constant al llarg del tractament tant amb queleritrina com amb estaurosporina. Aquest fet suggeria que l'endonucleasa no estava patint cap procés de degradació proteïca.

Per altra banda, ens vam plantejar la possibilitat que l'absència del fenotip apoptòtic provocat en el procés de mort desencadenat per queleritrina, es podia deure a un defecte en la localització nuclear de l'endonucleasa que impedisís el seu accés a la cromatina. Per aquesta raó, s'avaluà la localització subcel·lular de CAD al llarg de diferents temps de tractament amb queleritrina i en comparació a l'estaurosporina (Figura R16B). Per fer-ho, vam realitzar un subfraccionament cel·lular en el què es van obtenir 3 fraccions: la fracció citoplasmàtica (C), constituïda per proteïnes solubles en un tampó que contenia 0,1% de Tritó X-100, entre d'altres components; la fracció nucleoplasmàtica (N1), extreta amb un tampó hidrofílic i constituïda, per tant, pels components nuclears més hidrosolubles; i la fracció cromatínica (N2), composta per la cromatina i les proteïnes nuclears unides a aquesta, els quals es van ressuspèndre amb un tampó que contenia SDS a l'1%, entre d'altres constituents.

Tal i com s'observa en la figura R16B, CAD es localitzava, de forma basal, principalment en la fracció citoplasmàtica de les cèl·lules sense tractar, seguida d'una menor quantitat en la fracció nucleoplasmàtica i sent absent en la fracció cromatínica d'aquestes cèl·lules. Quan les cèl·lules eren sotmeses a un estímul citotòxic, l'endonucleasa es detectava a la fracció cromatínica (Figura R16B). En el cas de queleritrina, CAD es detectà en aquesta fracció a una hora de tractament i en el d'estaurosporina a partir de les 3 hores (Figura R16B). A més, aquesta localització subcel·lular de CAD detectada després del tractament amb queleritrina, es corresponia amb el temps de tractament (1 hora) en el qual s'havia detectat, tant l'activació de caspasa-3 com el processament d'ICAD (Figura R12). En el cas d'estaurosporina, cal esmentar que el temps de tractament en el qual s'havia localitzat l'endonucleasa a la fracció cromatínica (Figura R16B), també es correlacionava amb el temps d'activació de les caspases (Figura R11A). Per altra banda, es va observar una detecció més forta de CAD a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina que amb estaurosporina (Figura R16B). Pel que fa a la fracció nucleoplasmàtica, els nivells de detecció de CAD en el cas del tractament amb queleritrina tendien a mantenir-se però de manera menys intensa que els mostrats per les cèl·lules tractades amb estaurosporina (Figura R16B). En relació a la fracció citoplasmàtica, es detectà una baixada manifesta de CAD en el darrer punt temporal de tractament amb queleritrina (Figura R16B). Per últim, cal remarcar que la puresa de les diferents fraccions cel·lulars obtingudes s'analitzà mitjançant la detecció de les proteïnes piruvat quinasa M2 (PKM2) i topoisomerasa I, com a marcadors específics de la fracció citoplasmàtica i cromatínica, respectivament (Figura R16B).

Tot plegat, suggeria que CAD es localitzava a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina de forma sincrònica a l'activació prematura de caspases i al processament anticipat d'ICAD. A més, la quantitat de CAD present en aquesta fracció hauria de ser suficient per induir la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN, si ho comparem amb la

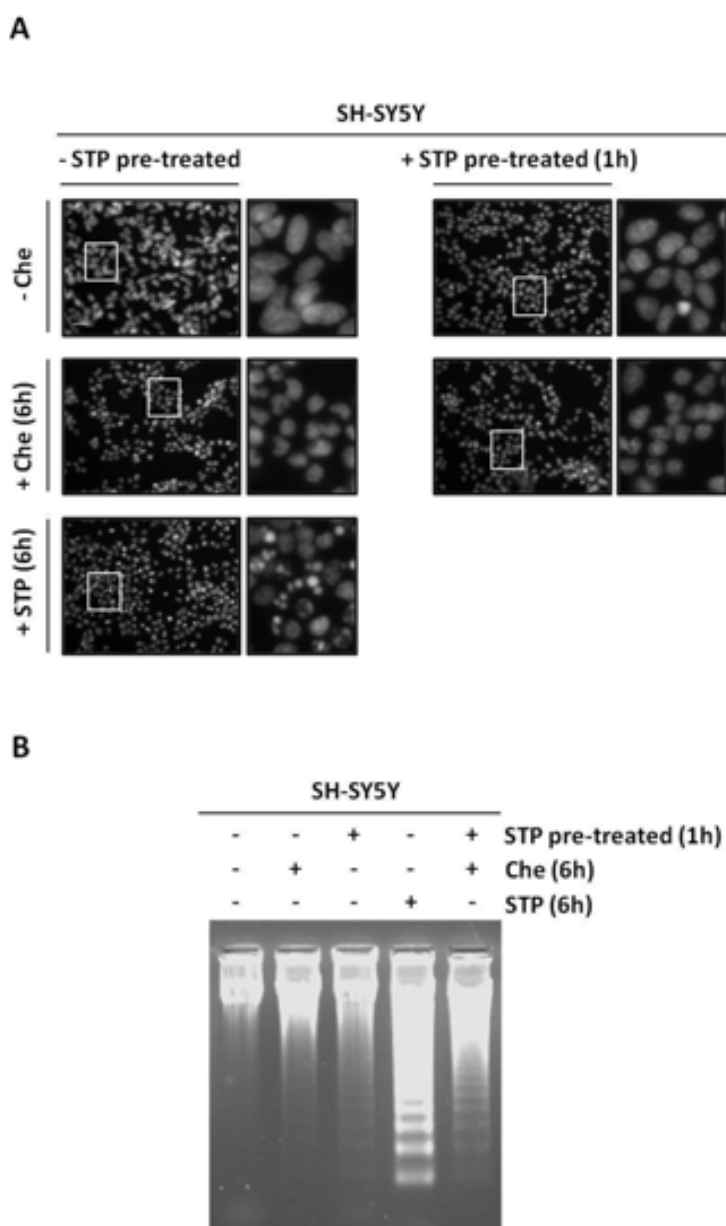
quantitat d'endonucleasa detectada en la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb estaurosporina.



**Figura R16. Estudi temporal dels nivells i de la localització cel·lular de CAD durant el tractament amb queleritrina.** Les cèl·lules SH-SY5Y es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP durant els diferents temps de tractament especificats en cada cas. **(A)** 20  $\mu$ g d'extractes totals de proteïna es carregaren per l'anàlisi dels nivells de CAD mitjançant la tècnica de *Western Blot*. La membrana emprada es tení amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(B)** Determinació de la presència de CAD a través de la tècnica de *Western Blot* en les diferents fraccions cel·lulars obtingudes mitjançant la realització d'un subfraccionament cel·lular en el qual s'aïllaren: la fracció citoplasmàtica, representada com a *C fraction*; la fracció nucleoplasmàtica, indicada com a *N1 fraction*; i la fracció cromatínica, mostrada com a *N2 fraction*. PKM2 i topoisomerasa I (*topoisomerase I*) s'utilitzaren com a controls de puresa de les fraccions C i N2 respectivament.

**15. El pre-tractament d'estaurosporina no és capaç de revertir el fenotip de mort induït per queleritrina cap a un procés de mort apoptòtic**

L'anàlisi de la localització subcel·lular de CAD establí que l'única diferència en les cèl·lules tractades amb queleritrina respecte a les d'estaurosporina era la translocació anticipada de CAD cap a la fracció cromatínica, ja en la primera hora de tractament. Aquest fet ens plantejà analitzar el fenotip de mort en cèl·lules pre-tractades durant una hora amb estaurosporina i posteriorment tractades durant 6 hores amb queleritrina (Figura R17). D'aquesta manera, es pretenia analitzar si CAD requeria d'una via de transducció de senyalització prèvia per tal de poder induir el fenotip de mort apoptòtic, afavorida per citotòxics com estaurosporina, però que no es donava durant el tractament amb queleritrina.



**Figura R17.** Anàlisi de la inducció dels *hallmarks* apoptòtics en cèl·lules pre-tractades amb estaurosporina i posteriorment sotmeses a un tractament amb queleritrina. Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (-) o es tractaren (+) amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP als temps de tractament especificats en cada cas. STP *pre-treated* indica la realització d'un tractament d'una hora amb l'insult apoptòtic previ a un posterior tractament de 6 hores amb Che. (A)

Imatges representatives de la morfologia nuclear induïda en les diferents condicions de tractament especificades. L'anàlisi morfològic es realitzà mitjançant la tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33258. Les cèl·lules emmarcades es mostren en magnificacions ubicades al lateral de les imatges i l'escala indica 50 µm. **(B)** Anàlisi electroforètic de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi per cada una de les diferents condicions de tractament indicades.

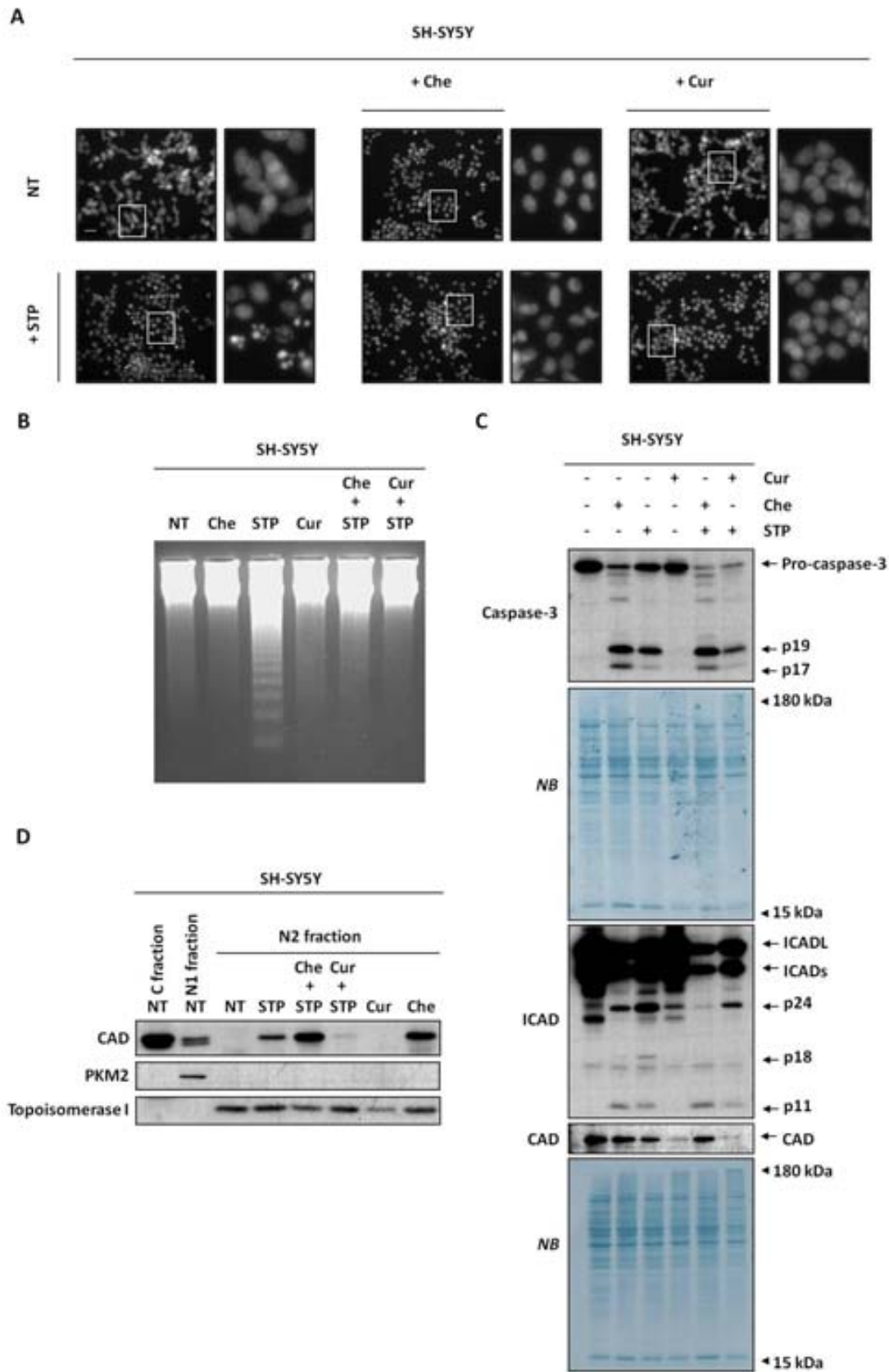
Tal i com s'observa en la figura R17, tant la morfologia apoptòtica com la degradació oligonucleosomal de l'ADN induïdes per estaurosporina s'inhibien quan queleritrina s'afegia al medi de cultiu. A més, la morfologia nuclear detectada en les cèl·lules pre-tractades amb estaurosporina i posteriorment tractades amb queleritrina, era similar a la manifestada en el tractament individual amb aquest alcaloide (Figura R17A). Per altra banda, cal afegir que les cèl·lules tractades amb queleritrina, després del tractament previ amb estaurosporina, van mostrar un inici de degradació LMW de l'ADN que no arribà a ser comparable amb la induïda per estaurosporina a 6 hores de tractament (Figura R17B). Malgrat l'aparició d'aquesta fragmentació, el patró observat de degradació ens va fer pensar que aquesta no es devia a l'acció de queleritrina, sinó que més aviat a l'acció citotòxica d'estaurosporina (comparar carrils 2 i 5 de la figura R17B). Així, els mecanismes de senyalització induïts per estaurosporina durant la primera hora d'exposició no permetien que queleritrina pogués provocar ni la morfologia apoptòtica ni la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN. Per tant, molt probablement, queleritrina estava inhibint el fenotip apoptòtic induït per estaurosporina. Per últim, cal remarcar que aquesta inhibició del fenotip apoptòtic succeïa malgrat estaurosporina es mantingués al medi de cultiu durant les posteriors 6 hores de tractament amb queleritrina.

### **16. Queleritrina impedeix el fenotip apoptòtic induït per estaurosporina manifestant el seu efecte intercalant sobre l'ADN**

En aquest punt, vam voler analitzar la inhibició del fenotip apoptòtic d'estaurosporina en presència de queleritrina estudiant el sistema ICAD·CAD i en comparació a un co-tractament d'estaurosporina amb l'agent citotòxic curcumina (cur). Cal dir, que aquest darrer compost s'havia descrit per la seva capacitat d'impedir el fenotip apoptòtic provocat per altres estímuls de mort a través d'un efecte d'inhibició directe de CAD (Sikora, Bielak-Zmijewska et al. 2006). Per fer-ho, en primer lloc s'analitzà el fenotip de mort en cèl·lules SH-SY5Y co-tractades durant 6 hores amb estaurosporina en presència de queleritrina o curcumina (Figures R18A i R18B). Cal remarcar que curcumina s'emprà a una dosi no tòxica per les cèl·lules, establerta prèviament en el laboratori (dades no mostrades). Tal i com s'observa en les figures R18A i R18B, tant la morfologia apoptòtica com la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN induïdes per estaurosporina s'inhibien quan queleritrina o curcumina estaven presents al medi de cultiu. Aquestes dades corroboraven tant els darrers resultats analitzats (Figura R17), com l'efecte inhibitori del fenotip apoptòtic descrit per curcumina (Sikora, Bielak-Zmijewska et al. 2006). En segon lloc, s'examinà tant l'activació de caspasa-3 com el processament d'ICAD (Figura R18C). En tots dos co-tractaments s'induí la proteòlisi de la caspasa als seus fragments actius p19 i p17 (Figura R18C). En el cas del co-tractament d'estaurosporina i queleritrina, la detecció d'aquests fragments era similar a l'obtinguda en el tractament individual de queleritrina i més potent que la desencadenada per estaurosporina (Figura R18C). En el co-tractament d'estaurosporina i curcumina, en canvi, la detecció dels fragments actius de caspasa-3 era menys potent, inclús, que l'observada en el tractament individual d'estaurosporina, principalment, a nivell de detecció del fragment p19 (Figura R18C). Aquesta diferència d'activació de caspasa-3 podria explicar la inhibició del fenotip apoptòtic d'estaurosporina per part de curcumina. Pel que fa al processament d'ICAD, en tots dos co-tractaments es detectà el fragment C-terminal p11 (Figura R18C). Tot i així, en el cas del co-tractament de curcumina i estaurosporina, aquest fragment es detectà de manera menys intensa



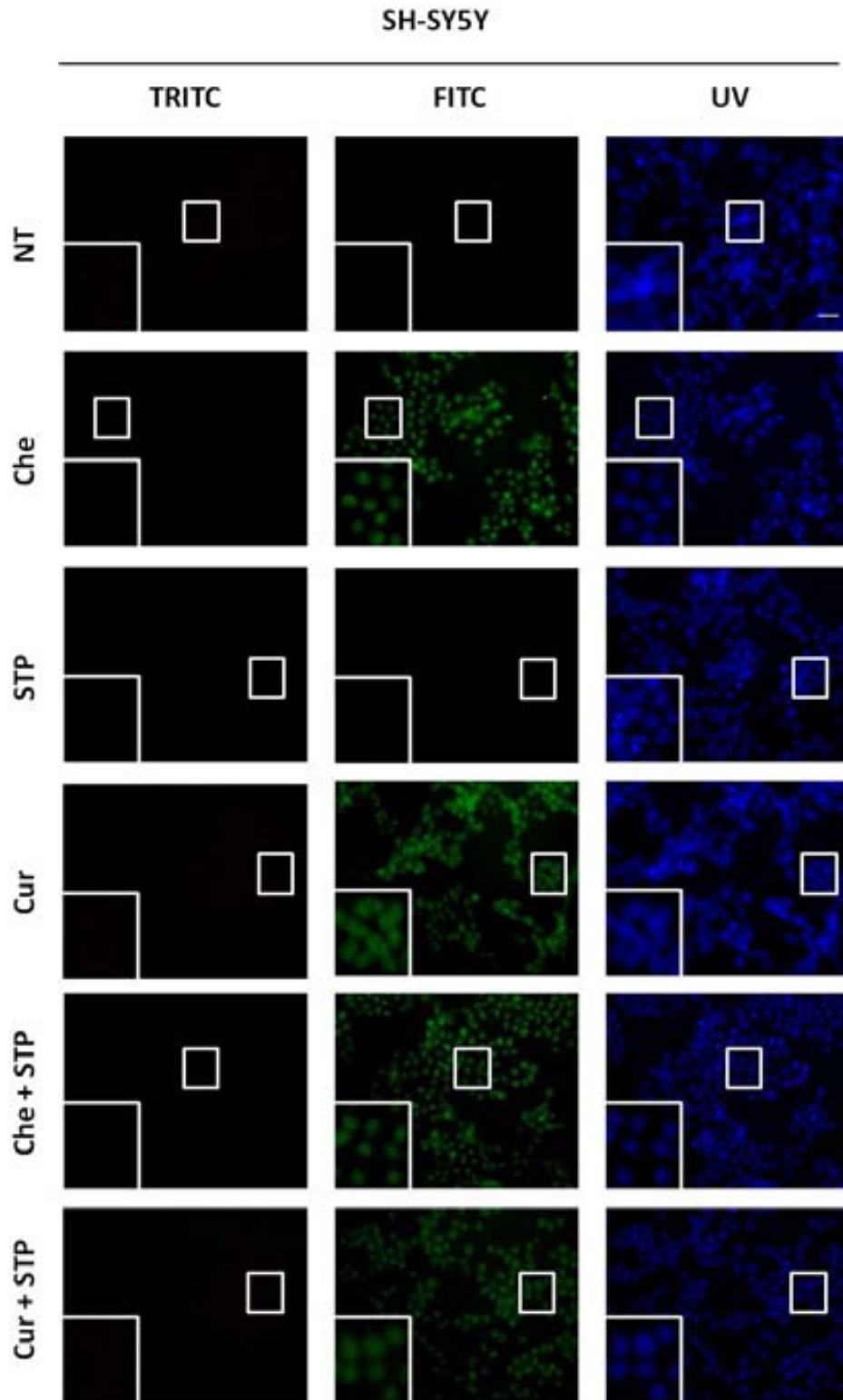
(Figura R18C). Cal remarcar, però, que en el cas del co-tractament de queleritrina i estaurosporina, el fragment C-terminal p24 es detectà de forma més feble que en la resta de tractaments (Figura R18C). Inclús, en aquest darrer co-tractament el fragment C-terminal p18 era absent, malgrat l'activació de caspasa-3 (Figura R18C). De fet, el fragment p18 només es detectava de forma clara en el tractament individual amb estaurosporina (Figura R18C). Per altra banda, resulta interessant remarcar que les cèl·lules tractades amb curcumina, malgrat no induir l'activació de caspasa-3, estaven processant ICAD-L de forma parcial, ja que s'arribà a detectar el fragment C-terminal p24 (Figura R18C). En darrer lloc, en les mateixes mostres en les quals s'havien analitzat l'activació de caspasa-3 i el processament d'ICAD, s'examinaren els nivells totals de CAD (Figura R18C). Aquests es mantingueren constants en tots els tractaments respecte al control de les cèl·lules sense tractar, excepte en aquells en els què curcumina estava present (Figura R18C). Aquest fet suggeria la inducció d'un procés específic de degradació de CAD desencadenat per curcumina (Figura R18C). Finalment, s'analitzà la localització subcel·lular de l'endonucleasa en els diferents co-tractaments (Figura R18D). Tal i com s'observa en la figura R18D, CAD es detectà a la fracció cromatínica de les cèl·lules sotmeses als dos co-tractaments (Figura R18D). Tot i així, cal esmentar que els nivells de CAD detectats en la fracció cromatínica de les cèl·lules co-tractades amb queleritrina i estaurosporina eren majors que els mostrats en les cèl·lules tractades amb estaurosporina i similars als observats en el tractament amb queleritrina (Figura R18D). Per contra, els nivells de CAD translocats a la fracció cromatínica de les cèl·lules co-tractades amb estaurosporina i curcumina eren menors que els detectats en el tractament d'estaurosporina (Figura R18D). Aquest fet es correlacionava amb els baixos nivells totals de CAD observats en aquest co-tractament (Figures R18C). Aquesta menor detecció de CAD a la fracció cromatínica de les cèl·lules co-tractades amb estaurosporina i curcumina podria explicar, en aquest cas, la inhibició del fenotip apoptòtic. Per altra banda, en el cas de queleritrina, el conjunt de resultats suggereixen que aquesta impedeix el fenotip de mort apoptòtic provocat per estaurosporina, malgrat CAD estigui present en nivells suficients a la fracció cromatínica.



**Figura R18. Queleritrina inhibeix el fenotip apoptòtic d'estaurosporina, malgrat CAD es trobi present a la fracció cromatínica.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che, 1  $\mu$ M de STP o 200  $\mu$ M de Cur, o bé, es co-tractaren a aquestes mateixes dosis amb STP i Che o STP i Cur durant 6h de tractament. (A) Anàlisi de la morfologia nuclear mitjançant la tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33258 en cada una de les diferents

condicions de tractament especificades. Les cèl·lules enquadrades es visualitzen en magnificacions mostrades al lateral de les imatges i la barra blanca equival a una escala de 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Determinació de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN per cada una de les diferents condicions de tractament esmentades mitjançant un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi. **(C)** Estudi de l'activació de caspasa-3, del processament d'ICAD i dels nivells totals de CAD a través de la tècnica de *Western Blot*. Els diferents fragments derivats de la proteòlisi de caspasa-3 i ICAD s'indiquen al lateral del panell i l'anàlisi es realitzà emprant 20  $\mu\text{g}$  d'extractes totals de proteïna. Les membranes emprades es tenyiren amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. **(D)** Estudi de la localització cel·lular de CAD en la fracció cromatínica (*N2 fraction*) a través d'un subfraccionament cel·lular en el que també es van analitzar la fracció citoplasmàtica (*C fraction*) i la fracció nucleoplasmàtica (*N1 fraction*). L'anàlisi s'executà mitjançant la tècnica de *Western Blot* i PKM2 i topoisomerasa I (*topoisomerase I*) s'empraren com a marcadors específics de les fraccions C i N2 respectivament.

Tot i així, el fet que els nivells de CAD estiguessin compromesos en el co-tractament d'estaurosporina i curcumina, hauria d'implicar la inducció d'una morfologia apoptòtica tipus I (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2013). En canvi, les cèl·lules co-tractades amb aquests dos compostos van mostrar una morfologia nuclear no apoptòtica (Figura R18A). Recentment, s'ha reportat la capacitat de curcumina per interaccionar amb l'ADN principalment per unió al solc menor, encara que també pot exhibir propietats intercalants sobre l'ADN (Kumar and Bora 2012). A més, s'ha descrit que queleritrina exhibeix propietats intercalants en l'ADN amb una preferència d'unió a seqüències d'aquest riques en GC contigües (Bai, Zhao et al. 2006; Kamins'kyi, Kryv'iak et al. 2006; Bajaj, McLean et al. 1990). Tot plegat, ens plantejà a analitzar l'efecte intercalant sobre l'ADN tant de curcumina com de queleritrina. Les propietats d'unió a l'ADN per part d'aquests compostos podrien ser igualment presents en els processos de mort cel·lular que es desencadenaven en presència de queleritrina o curcumina i relacionar-se, en conseqüència, amb la inhibició del fenotip de mort apoptòtic. Per aquesta raó, vam voler analitzar si en els co-tractaments en els quals s'estava inhibint el fenotip apoptòtic d'estaurosporina, queleritrina i curcumina estaven exhibint aquests tipus de propietats. Per tal de realitzar aquest anàlisi, vam tenir en compte l'avantatge que prenen aquest tipus de compostos quan, després d'estar units a l'ADN, si s'exciten a una longitud d'ona concreta ( $\lambda_{\text{excitació}}$ ), emeten una senyal de fluorescència a una altra determinada longitud d'ona ( $\lambda_{\text{emissió}}$ ). De forma més concreta, en el cas de queleritrina s'ha descrit que aquesta, després d'excitar-se a una  $\lambda$  de 488 nm emet la màxima senyal de fluorescència a una  $\lambda$  de 556 nm. En conseqüència, aquesta senyal es podria detectar a través del filtre de fluorescència FITC (amb un pas de banda de  $\lambda_{\text{excitació}}$  entre 465-495 nm i de  $\lambda_{\text{emissió}}$  entre 515-555 nm), si tenim present, a més, que l'espectre d'emissió de queleritrina s'estableix aproximadament entre les  $\lambda$  de 500 i 625 nm (Liu, Liu et al. 2006). Pel que fa a curcumina, aquesta sent excitada a una  $\lambda$  de 465 nm, emet la màxima senyal de fluorescència a una  $\lambda$  de 518 nm, la qual es podria detectar també a través del filtre de fluorescència FITC (Patra and Barakat 2011). Tenint present el conjunt d'aquestes dades, vam procedir a realitzar un anàlisi morfològic en cada un dels diferents tractaments realitzats mitjançant la tinció amb Hoechst 33258. Cal recordar, que aquest agent d'unió a l'ADN permet la visualització de l'aspecte dels nuclis només a través del filtre de fluorescència ultravioleta (UV). Tal i com s'observa en la figura R19, la detecció d'aquests només en el filtre UV, es mostrava sempre que les cèl·lules no havien estat tractades ni amb queleritrina ni amb curcumina. Les cèl·lules que havien estat sotmeses a un tractament amb algun d'aquests compostos van manifestar la seva morfologia nuclear tant en el filtre de fluorescència UV com en el de FITC. Tot plegat, suggeria que els compostos de queleritrina i curcumina, tant de forma individual com en el seu co-tractament amb estaurosporina, exhibien les seves propietats d'unió a l'ADN. I aquest fet coincidia en les condicions de tractament en les quals s'havia inhibit el fenotip de mort apoptòtic (Figures R18A i R18B).



**Figura R 19. Anàlisi de les propietats d'unió a l'ADN de queleritrina i curcumina.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu\text{M}$  de Che, 1  $\mu\text{M}$  de STP o 200  $\mu\text{M}$  de Cur o bé, es co-tractaren a aquestes mateixes concentracions amb STP i Che (STP+Che) o STP i Cur (STP+Cur) durant 6h. Les cèl·lules es van tenir amb Hoechst 33258, el qual permeté en tots els tractaments la visualització dels nuclis en el filtre de fluorescència ultravioleta (UV). La determinació de les propietats d'unió a l'ADN s'examinà mitjançant l'anàlisi morfològic de l'aspecte dels nuclis en els altres filtres de fluorescència, sent FITC el d'emissió de fluorescència verda; i TRITC, el d'emissió de fluorescència vermella. Les cèl·lules emmarcades es representen en les magnificacions ubicades a la part dreta inferior de cada imatge. La barra blanca indica 50  $\mu\text{m}$ .

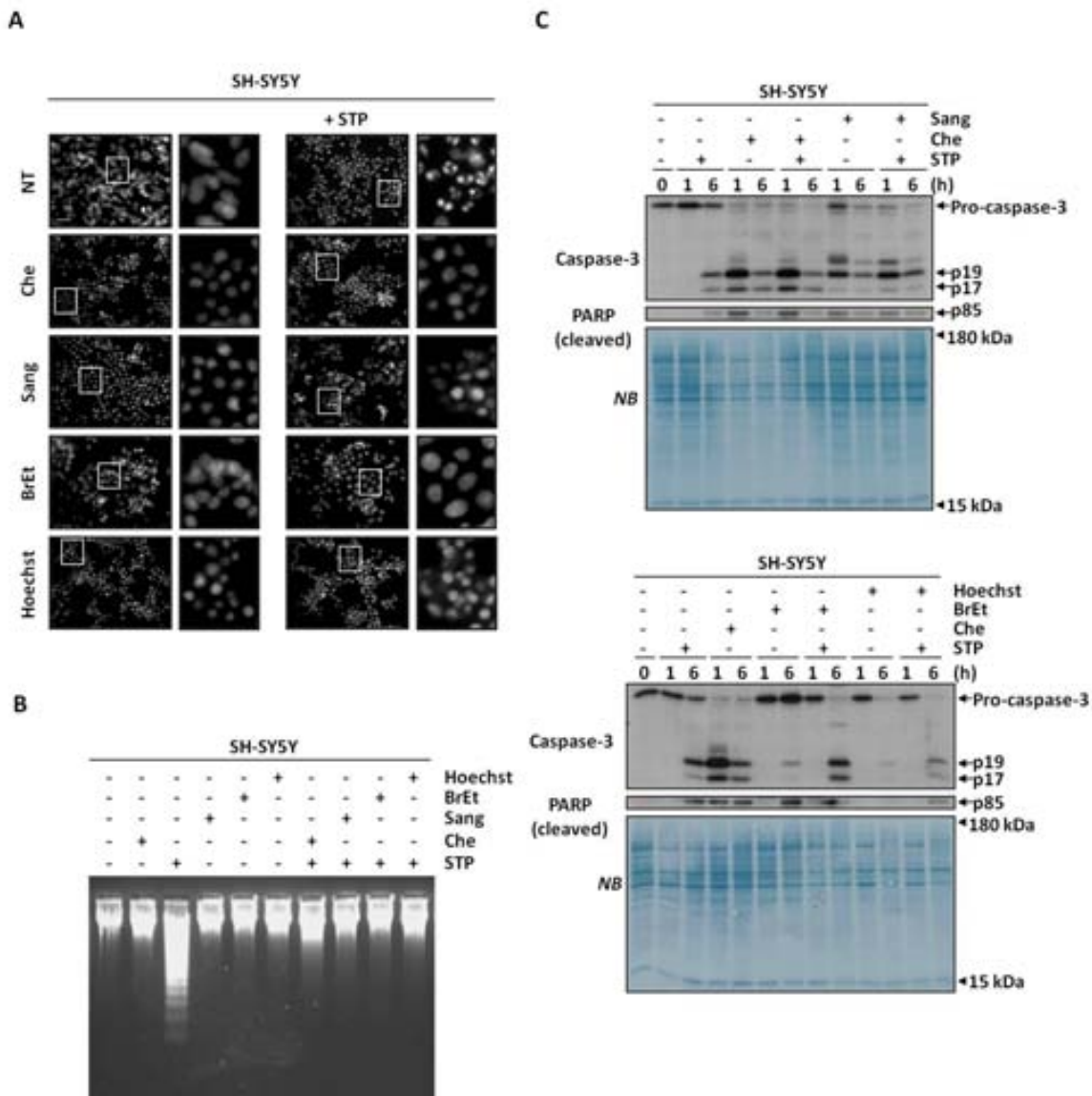
## 17. El fenotip apoptòtic provocat per l'estaurosporina s'inhibeix en presència de compostos amb propietats d'unió a l'ADN

Per tal d'examinar la rellevància de la inhibició del fenotip apoptòtic d'estaurosporina quan al medi de cultiu s'estava afegint un agent amb propietats d'unió a l'ADN, es procedí a realitzar un anàlisi dels *hallmarks* apoptòtics induïts per aquest alcaloide en presència d'altres compostos que presentaven aquest tipus de propietats. En concret, s'empraren: sanguinarina (Sang), el qual pertany a la mateixa família de compostos que queleritrina i és intercalant de l'ADN, però amb preferència d'unió a seqüències riques en GC alternades (Bai, Zhao et al. 2006)); Hoechst 33258, agent d'unió al solc menor de l'ADN amb preferència a les seqüències riques en AT (Fox and Waring 1984); i bromur d'etidi, compost intercalant de l'ADN amb capacitat també d'unir-se al solc menor d'aquest (Jain, Tsai et al. 1977). L'estudi es dugué a terme després de realitzar un pre-tractament de les cèl·lules SH-SY5Y durant 30 minuts amb els diferents agents d'unió a l'ADN i un posterior tractament de 6 hores amb estaurosporina. Tal i com mostra la figura R20A, la morfologia apoptòtica provocada per estaurosporina s'inhibia sempre que les cèl·lules s'havien pre-tractat amb algun dels compostos que presentaven propietats d'unió a l'ADN. De fet, aquests compostos van induir un fenotip nuclear no apoptòtic tant el tractament realitzat amb estaurosporina, com en el seu tractament individual (Figura R20A). A més, l'aspecte dels nuclis detectats en els tractaments de tots aquests agents era similar a l'induït per queleritrina (Figura R20A). En el cas del bromur d'etidi, però, la morfologia nuclear manifestada semblava no caracteritzar-se per cap afectació al tamany del nucli com les que mostraven els tractaments realitzats amb els altres agents d'unió a l'ADN, si l'aspecte nuclear es comparava amb el del control de les cèl·lules sense tractar (Figura R20A). De la mateixa manera, la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN desencadenada per estaurosporina també s'inhibia quan les cèl·lules es pre-tractaven amb qualsevol d'aquests agents d'unió a l'ADN (Figura R20B). A més, el tractament individual d'aquests compostos tampoc va promoure aquesta degradació de l'ADN (Figura R20B).

Tenint en compte que el fenotip no apoptòtic induït per queleritrina coincidia amb una activació prematura de les caspases, vam dur a terme un anàlisi d'aquest tipus d'activació en les cèl·lules pre-tractades amb els diferents agents d'unió a l'ADN i posteriorment tractades amb estaurosporina (Figura R20C). Per fer-ho, es realitzà un anàlisi del processament de caspasa-3 i d'un substracte genèric de caspases (PARP) mitjançant la tècnica de *Western Blot* durant tractaments d'una hora, per tal de poder detectar l'activació prematura de les caspases; i de 6 hores, donat que aquest era el temps que s'havia emprat per l'anàlisi realitzat dels *hallmarks* apoptòtics (Figura R20C). Tal i com s'observa en la figura R20D, les cèl·lules que manifestaven un fenotip no apoptòtic a 6h de tractament amb els diferents agents d'unió a l'ADN, tant en presència com en absència d'estaurosporina, van mostrar tant caspasa-3 processada als fragments actius p19 i p17, com la proteòlisi de PARP al fragment p85 (Figura R20C). En el cas dels tractaments individualitzats de Hoechst i bromur d'etidi, però, tan sols es detectà el fragment p19 de caspasa-3 i en el cas particular de Hoechst, PARP no s'arribà a proteolitzar (Figura R20C). Per contra, l'addició d'estaurosporina al medi de cultiu en aquests dos tractaments és on va potenciar més l'activació de caspases (Figura R20C). En concret, la presència d'estaurosporina en els tractaments de Hoechst i bromur d'etidi induí la generació tant del fragment actiu p17 de caspasa-3, com del fragment p85 de PARP en el cas particular de Hoechst (Figura R20C). En canvi, els tractaments amb queleritrina i sanguinarina en presència d'estaurosporina van mostrar una activació de caspases similar a l'observada en els seus tractaments individualitzats (Figura R20C). A una hora de tractament, en canvi, l'activació de caspases tan sols es manifestà en les cèl·lules que havien

estat tractades amb queleritrina i sanguinarina i independentment de la presència d'estaurosporina al medi de cultiu (Figura R20C).

En conjunt, els diferents resultats obtinguts suggereixen que la inhibició del fenotip apoptòtic es pot relacionar amb compostos que presenten propietats d'unió a l'ADN, malgrat aquests puguin arribar a induir una activació de les caspases. No obstant, l'activació prematura d'aquestes no es pot generalitzar amb altres agents d'unió a l'ADN, sinó que sembla exclusiu de compostos amb propietats intercalants a l'ADN pertanyents a la família de benzofenantridines, tals com queleritrina i sanguinarina.



**Figura R20. Estudi de la inducció del fenotip apoptòtic d'estaurosporina en cèl·lules pre-tractades amb agents d'unió a l'ADN.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (indicades com a NT o (-)) o es pre-tractaren (+) amb diferents agents d'unió a l'ADN a les concentracions de 20 µM de Che, 20 µM de Sang, 400 µM de BrEt o 100 µM de Hoechst durant 30 minuts de pre-tractament. Posteriorment a aquest pre-tractament, STP s'afegí al medi de cultiu a una concentració de 2 µM durant 6h de tractament. **(A)** Anàlisi de la morfologia nuclear induïda en cada un dels diferents tractaments esmentats mitjançant la tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33258. Les cèl·lules emmarcades es visualitzen en magnificacions situades al lateral de les imatges. L'escala indica 50 µm. **(B)** Determinació de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi. **(C)** Anàlisi del processament de caspasa-3 i del substrate genèric de caspases PARP a través de la tècnica de *Western Blot*. L'estudi

d'activació de caspases es realitzà tant a 1 hora com a 6 hores de tractament. Les membranes emprades es tenyiren amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes.

### **18. Tant l'addició d'antioxidants tiòlics com la d'un inhibidor de la necroptosi al medi de cultiu, eviten la mort cel·lular induïda per queleritrina**

Amb el propòsit de proseguir en l'estudi de les possibles causes que estiguessin alterant l'estat funcional de CAD i que fossin, en conseqüència, responsables de la inducció del fenotip no apoptòtic desencadenat per queleritrina, es decidí realitzar un anàlisi de la mort induïda per queleritrina en presència de diferents tipus d'inhibidors. D'aquesta manera, es pretenia examinar si els esdeveniments cel·lulars associats a la inhibició d'aquests compostos tenien una implicació prou determinant en el procés de mort desencadenat per queleritrina com per ser claus en la inducció d'aquest fenotip no apoptòtic.

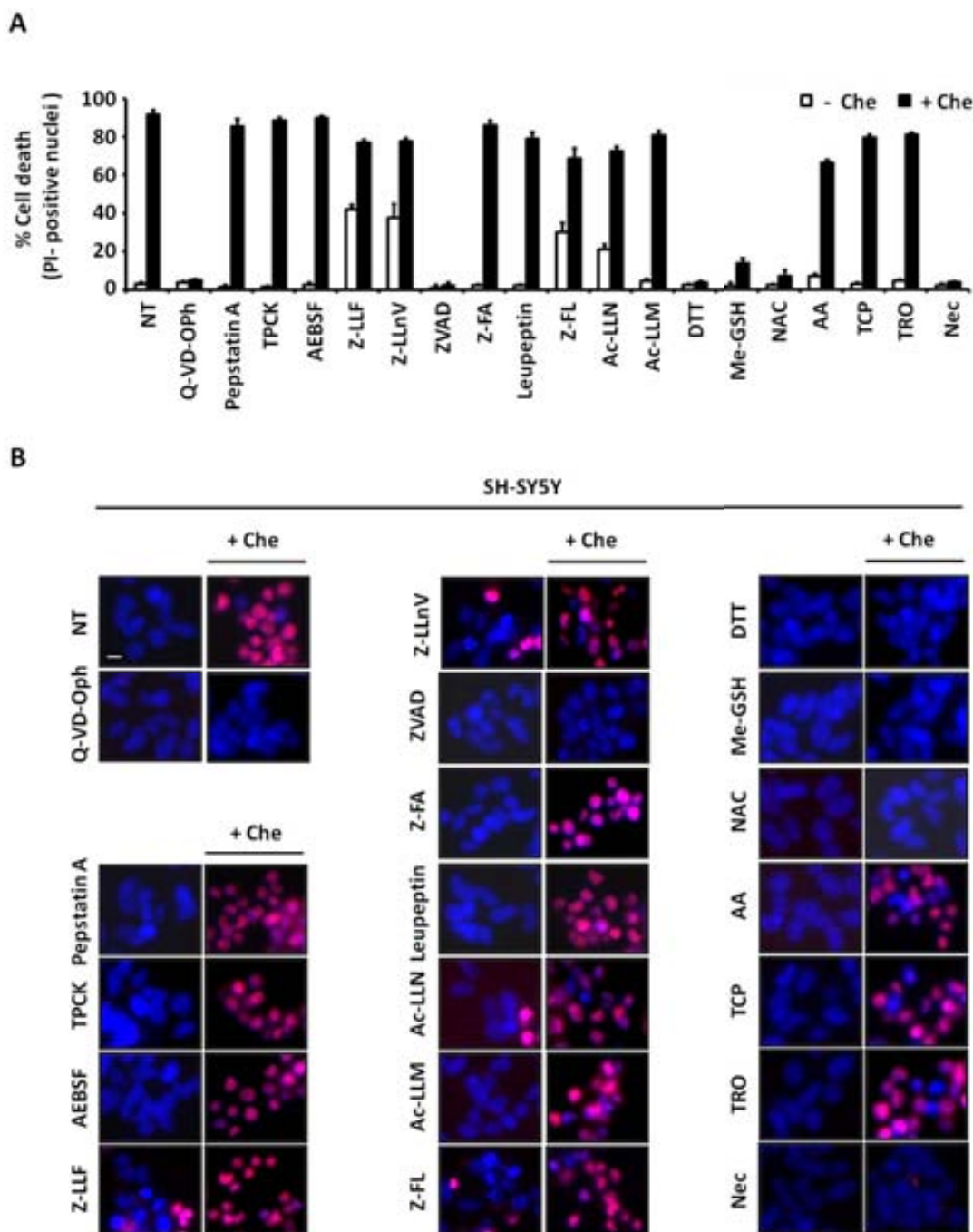
Per tal realitzar aquest tipus d'anàlisi, les cèl·lules SH-SY5Y es pre-tractaren durant una hora amb diferents tipus d'inhibidors i posteriorment, es tractaren amb queleritrina durant 24 hores. En cada un d'aquests tractaments, s'avaluà la mort cel·lular i es dugué a terme un anàlisi morfològic mitjançant la tècnica de doble tinció nuclear de Hoechst i PI (Figura R21).

Pel que fa als diferents inhibidors emprats, aquests van incloure: compostos inhibidors de diferents tipus de proteases, agents antioxidants i un inhibidor necroptòtic. Entre el primer grup es van incloure inhibidors de proteases de tipus aspartat com la pepstatina A, la qual és potent inhibidora tant de la cathepsina D, com de la pepsina i la renina (Nowakowska and Godlewski 1979; Umezawa, Aoyagi et al. 1970; Moxey and Trier 1978); AEBSF, inhibidor d'ampli espectre de proteases en serina (Baker and Cory 1971; Markwardt, Drawert et al. 1974); i agents com el TPCK, el qual inhibeix proteases tant de tipus serina, com la  $\alpha$ -quimiotripsina (Schoellmann and Shaw 1963), com de tipus cisteïna, entre les quals destaquen la bromelaïna i la papaïna (Murachi and Kato 1967; Whitaker and Perez-Villase nor 1968). Per altra banda, també s'inclogueren inhibidors específics de determinats tipus de proteases com el compost Z-LLF, el qual inhibeix calpaïnes (proteases de tipus cisteïna), cathepsines (inclouen proteases de tipus serina, cisteïna i aspartat) i, de forma principal, l'activitat *quimiotrypsin-like* del proteosoma 20S (Tsubuki, Saito et al. 1996; Sasaki, Kishi et al. 1990; Vinitsky, Michaud et al. 1992); Z-LLnV, amb els mateixos efectes d'inhibició que Z-LLF però sense inhibir les cathepsines (Tsubuki, Saito et al. 1996; Vinitsky, Michaud et al. 1992); Z-VAD, inhibidor d'ampli espectre de caspases (proteases de tipus cisteïna) amb capacitat també d'inhibir calpaïnes i cathepsines (entre les quals mostra elevada afinitat per les cathepsines B i H, totes dues proteases sent de tipus cisteïna) (Waterhouse, Finucane et al. 1998; Rozman-Pungercar, Kopitar-Jerala et al. 2003; Schotte, Declercq et al. 1999); i leupeptina, la qual inhibeix diferents proteases de tipus cisteïna que inclouen calpaïnes (Moldoveanu, Campbell et al. 2004), la papaïna (Schultz, Varma-Nelson et al. 1989) i les cathepsines B, H i L (Knight 1980; Barrett, Kembhavi et al. 1982), amb un efecte inhibitori també en proteases de tipus serina com la plasmina (Anonick and Gonias 1991), la calicreïna (McConnell, York et al. 1993) i la tripsina (Kuramochi, Nakata et al. 1979). Per contra, altres dels compostos que s'empraren, es caracteritzaven per inhibir de forma específica determinades proteases però sent totes de tipus cisteïna com ara el compost Z-FA, el qual és un potent inhibidor de les cathepsines B, L i S (Van Noorden, Smith et al. 1988; Bromme, Steinert et al. 1989), de les proteases papaïna i cruzaïna (McGrath, Eakin et al. 1995; Harth, Andrews et al. 1993) i pot arribar a inhibir de forma parcial el processament de les caspases efectores (Lopez-Hernandez, Ortiz et al. 2003); Ac-LLN, un potent inhibidor de cathepsina L amb capacitat també per inhibir la cathepsina B, les calpaïnes I i

II (Sasaki, Kishi et al. 1990; Tsubuki, Saito et al. 1996); Ac-LLM, compost amb les mateixes característiques que Ac-LLN però més potent a nivell d'inhibició de la calpaïna I (Sasaki, Kishi et al. 1990; Tsubuki, Saito et al. 1996; Vinitsky, Michaud et al. 1992); i Z-FL, inhibidor específic de cathepsina S, tot i que de manera feble també pot inhibir la cathepsina B (Sasaki, Kishi et al. 1990; Chen, Chang et al. 2011). Pel que fa als agents antioxidants, es van incloure compostos inhibidors de l'oxidació dels grups tiols com la forma del glutatió metilada (Me-GSH), el DTT i la n-acetilcisteïna (NAC); i antioxidants no tiòlics que principalment inhibeixen l'oxidació dels lípids, tals com l'àcid ascòrbic (AA), l' $\alpha$ -tocopherol (TCP) i el trolox (TRO) (per més informació d'aquests compostos, veure l'apartat de 2.3.2.B.1.4. "Processos de detoxificació cel·lular"). Per últim, s'incloué necrostatina-1 (Nec), com inhibidor de la necroptosi (Degterev, Huang et al. 2005; Degterev, Hitomi et al. 2008).

Tal i com s'observa en la figura R21, la mort cel·lular induïda per queleritrina s'evitava quan algun dels antioxidants tiòlics s'afegia al medi de cultiu. En aquests casos, el percentatge de mort provocat per queleritrina (91,56%) es va reduir a percentatges del 3,87% en el cas del tractament amb DTT, 13,65% pel del glutatió i 6,86% en el realitzat en presència de n-acetilcisteïna (Figura R21A). A més, cal remarcar que cap dels altres antioxidants emprats, van reduir d'aquesta manera els percentatges de mort desencadenats per queleritrina (Figura R21A). Tan sols s'arribà a detectar una reducció d'aquests d'aproximadament el 20% en el cas de l'àcid ascòrbic (Figura R21A). Per altra banda, l'inhibidor de la necroptosi també va ser capaç de prevenir la mort desencadenada per queleritrina i assolint nivells de mort tan baixos (3,73%) com els detectats en els tractaments de DTT i n-acetilcisteïna (Figura R21A). Cal afegir, que els inhibidors d'ampli espectre de caspases, Q-VD-OPh i ZVAD, també van protegir les cèl·lules SH-SY5Y de la mort induïda per queleritrina (Figura R21A). Aquest fet corroborava que el procés de mort desencadenat per aquest alcaloide s'estava realitzant de manera depenent de caspases (Figura R21A). A més, cal esmentar que l'anàlisi morfològic derivat de la doble tinció nuclear amb PI i Hoechst, rebelava que tots els inhibidors que havien evitat el procés de mort cel·lular induït per queleritrina, també impedièen el fenotip nuclear no apoptòtic provocat per aquest alcaloide (Figura R21B). Per últim, cal tenir en compte que varis inhibidors de cathepsines i calpaïnes com Z-LLF, Z-LLnV, Z-FL i Ac-LLN, estaven en el seu tractament individual induint percentatges de mort entre el 20 i el 40% (Figura R21A). En aquest sentit, cal tenir present que en aquests casos es podia estar afavorint a la inducció d'una major toxicitat en presència de queleritrina. Malgrat aquesta consideració, però, el percentatge de mort de queleritrina en aquests tractaments es va reduir aproximadament un 10% (Figura R21A). Aquest fet va suggerir una subtil implicació d'aquest tipus de proteases en el desencadenament del procés de mort induït per queleritrina. En qualsevol cas, el conjunt de dades mostrava els processos d'estrès oxidatiu i els mecanismes de senyalització associats a la necroptosi com a factors determinants en el procés de mort provocat per queleritrina.



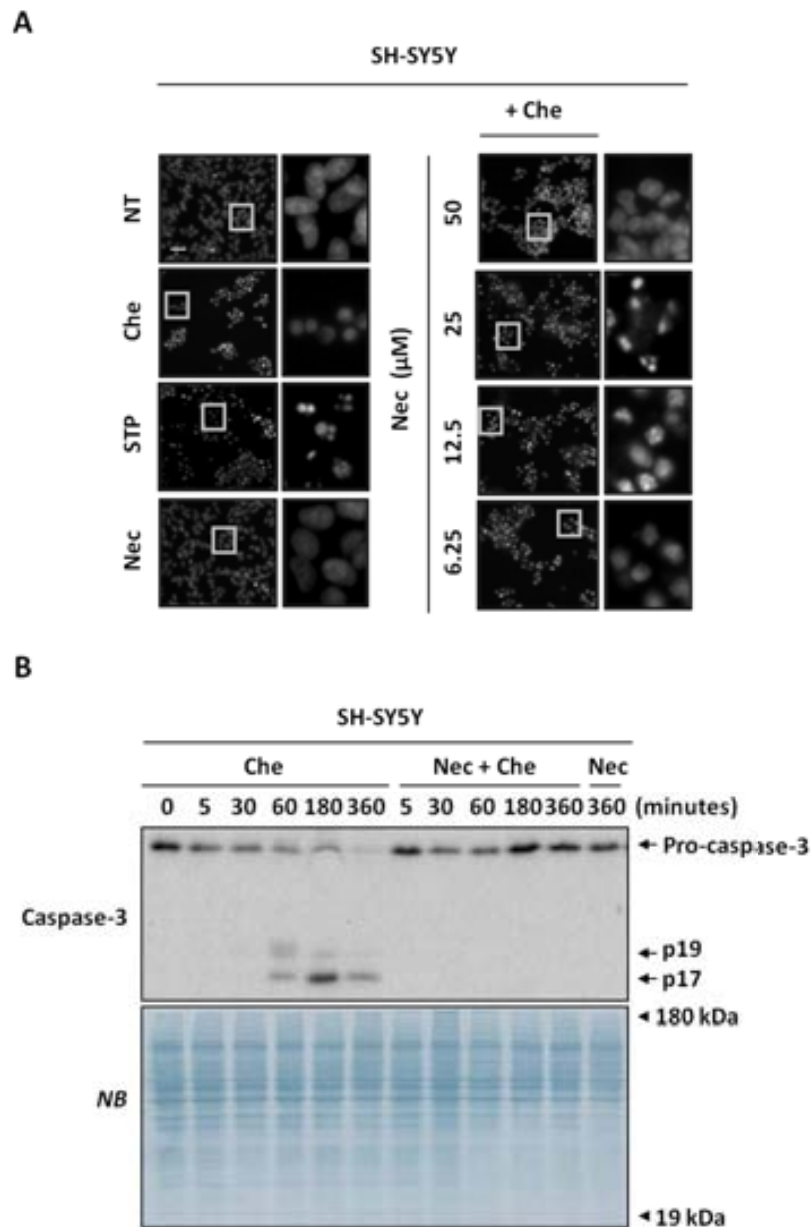


**Figura R21. Diversos antioxidants tiòlics i un inhibidor de necroptosi impedeixen la mort cel·lular induïda per queleritrina.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es pre-tractaren durant una hora amb diferents inhibidors a les concentracions finals de: 20  $\mu$ M de Q-VD-Oph, 100  $\mu$ M de pepstatina A (*Pepstatin A*), 10  $\mu$ M de TPCK, 150  $\mu$ M d'AEBSF, 20  $\mu$ M de Z-LLF, 20  $\mu$ M de Z-LLnV, 50  $\mu$ M de ZVAD, 100  $\mu$ M de Z-FA, 100  $\mu$ M de leupeptina (*Leupeptin*), 20  $\mu$ M d'Ac-LLN, 20  $\mu$ M d'Ac-LLM, 20  $\mu$ M de Z-FL, 2 mM de DTT, 5 mM de Me-GSH, 5 mM de NAC, 100  $\mu$ M d'AA, 1 mM de TCP, 100  $\mu$ M de TRO o 50  $\mu$ M de Nec. Posteriorment a la realització del pre-tractament, s'addicionà Che (indicat com a + Che) al medi de cultiu a una concentració final de 10  $\mu$ M durant 24h de tractament. **(A)** Quantificació de la mort cel·lular induïda per Che en cada un dels diferents tractaments esmentats mitjançant el recompte de nuclis positius per PI respecte els totals tenyits per Hoechst 33342. Les barres blanques i negres indiquen els diferents tractaments dels inhibidors en absència i presència de Che respectivament. **(B)** Imatges representatives de la morfologia nuclear induïda en els diferents tractaments esmentats, després de realitzar la doble tinció de les cèl·lules amb PI i Hoechst emprada en **(A)**. Les cèl·lules viables es visualitzen en blau a través de la seva tinció amb Hoechst i les cèl·lules mortes s'il·lustren en rosa per la doble tinció nuclear de PI i Hoechst. La barra blanca indica 50  $\mu$ m.

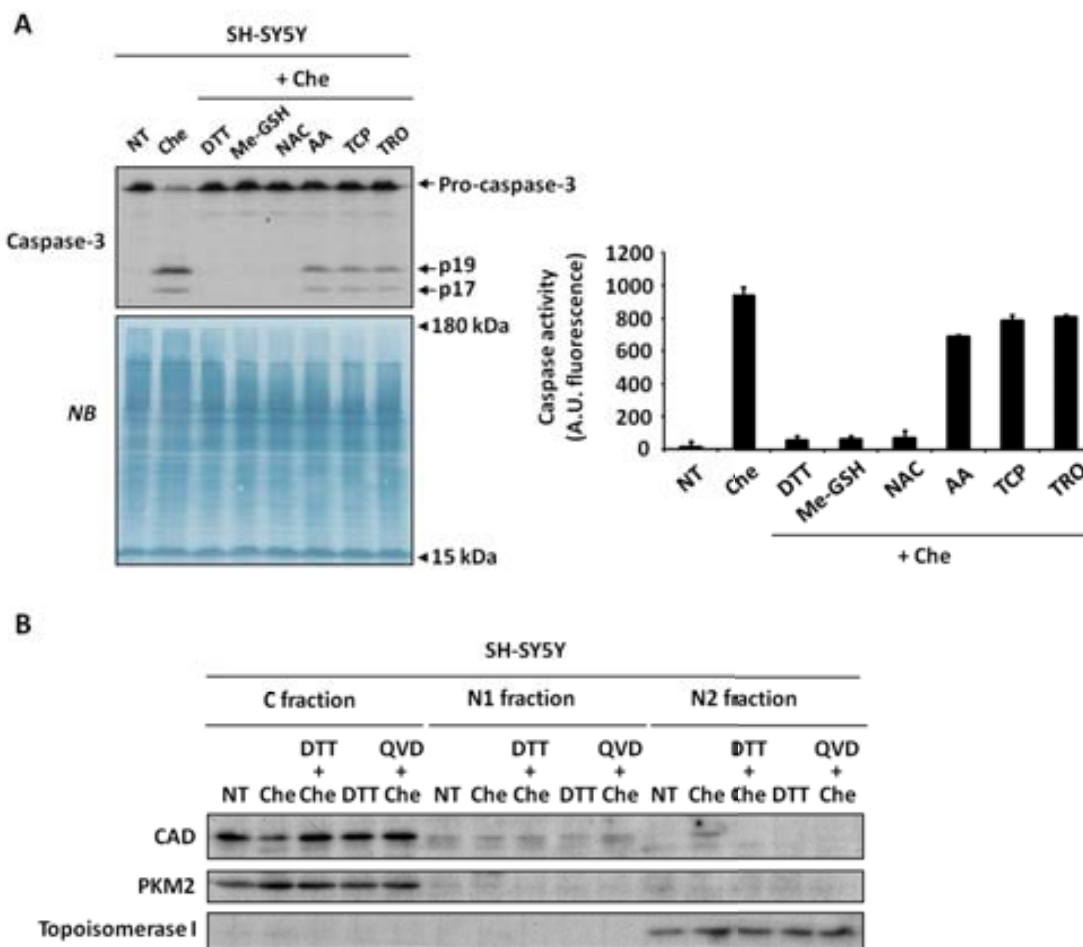
Pel que fa a l'inhibidor de la necroptosi, d'entrada vam voler establir la concentració mínima d'aquest compost amb la qual s'estava inhibint la morfologia nuclear induïda per queleritrina. Per això, es realitzà un anàlisi morfològic després de pre-tractar les cèl·lules SH-SY5Y durant 1 hora amb diferents concentracions de necrostatina-1 i posteriorment tractar-les durant 24 hores amb queleritrina (Figura R22A). Tal i com mostra la figura R22A, l'anàlisi morfològic revelà 50  $\mu$ M com a la dosi de necrostatina-1 requerida per impedir la inducció del fenotip nuclear no apoptòtic provocada per queleritrina. Tenint en compte que el fenotip no apoptòtic induït per queleritrina era depenent de caspases, vam voler determinar l'estat d'activació d'aquestes en la concentració de necrostatina-1 en la qual s'estava evitant aquest fenotip nuclear. Per fer-ho, es realitzà un anàlisi comparatiu del processament de caspasa-3 en cèl·lules tractades amb queleritrina amb presència de necrostatina-1, respecte a cèl·lules tractades únicament amb aquest alcaloide al llarg d'un curs temporal (Figura R22B). Tal i com s'observa en la figura R22B, caspasa-3 no es proteolitza en cap dels diferents temps de tractament amb queleritrina en les cèl·lules que havien estat pre-tractades amb necrostatina-1. Per tant, tot plegat suggereix que necrostatina-1 era capaç d'impedir tant el fenotip de mort no apoptòtic provocat per queleritrina com inhibir l'activació de les caspases.

Per altra banda, també es realitzà un anàlisi de l'activació de caspases en les cèl·lules que havien estat pre-tractades amb diferents agents antioxidants i posteriorment sotmeses a 24 hores de tractament amb queleritrina (Figures R21 i R23A). Per fer-ho, es realitzà tant un anàlisi del processament de caspasa-3 mitjançant la tècnica de *Western Blot*, com l'assaig d'activitat de caspases DEVDasa (Figura R23A). Tal i com s'observa en la figura R23A, els mateixos agents antioxidants que havien impedit el fenotip de mort amb queleritrina (Figura R21), també van evitar l'activació de caspases desencadenada per aquest alcaloide. Per una banda, els fragments actius de la caspasa-3 (p19 i p17) eren absents en les cèl·lules que havien estat pre-tractades amb els antioxidants tiòlics DTT, glutatió o n-acetilcisteïna (Figura R23A). D'altra banda, l'assaig DEVDasa va mostrar en els diferents pre-tractaments realitzats amb aquests mateixos antioxidants tiòlics, una reducció dels valors d'activitat de caspases induïts per queleritrina (Figura R23A). Pel que fa als altres antioxidants emprats (àcid ascòrbic,  $\alpha$ -tocopherol i trolox), les cèl·lules que havien estat pre-tractades amb aquests no van mostrar aquesta inhibició de les caspases (Figura R23A). Cal remarcar, però, que en aquests tractaments no s'induí una baixada de la pro-forma de caspasa-3 ni una detecció dels fragments actius d'aquesta tan potent com la manifestada en el tractament individual amb queleritrina (Figura R23A). A més, els valors d'activitat de caspases van disminuir lleugerament en el cas del pre-tractament amb aquest tipus d'antioxidants (Figura R23A). En conjunt, aquestes darreres dades realcen la implicació dels processos cel·lulars oxidatius en el desencadenament de la mort induïda per queleritrina i estableixen el dany oxidatiu de tipus tiòlic com a un factor clau per la inducció d'aquesta. Tenint en compte aquesta consideració i els darrers resultats obtinguts, vam voler determinar quina era la localització subcel·lular de CAD en presència de queleritrina i DTT. Per aquesta raó, es realitzà un subfraccionament cel·lular en el qual s'aïllaren la fracció citoplasmàtica (*C fraction*), la nucleoplasmàtica (*N1 fraction*) i la cromatínica (*N2 fraction*), després de pre-tractar les cèl·lules durant 1 hora amb l'antioxidant DTT i sotmetre-les a un tractament posterior d'una hora amb queleritrina (Figura R23B). Tal i com s'observa en la figura R23B, CAD tan sols es detectà a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina, sent absent a la de les cèl·lules sotmeses al tractament amb queleritrina tant en presència de DTT com de l'inhibidor de caspases Q-VD-OPh (QVD). Cal esmentar, que el tractament amb queleritrina i Q-VD-OPh s'havia utilitzat com a control negatiu de detecció de CAD a la fracció cromatínica. Per altra banda, cal afegir que la localització de CAD en les condicions de tractament amb queleritrina i DTT era similar a la mostrada de forma basal en les

cèl·lules sense tractar (Figura R23B). En concret, en aquestes condicions de tractament CAD també es detectava a la fracció citoplasmàtica i, amb menors nivells, a la nucleoplasmàtica (Figura R23B). Per últim, la detecció de PKM2 i de la topoisomerasa I a les respectives fraccions citoplasmàtica i cromàtica, corroborà la puresa de les fraccions analitzades (Figura R23B).



**Figura R22. Necrostatina-1 inhibeix l'activació de caspases induïda per queleritrina.** (A) Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es pre-tractaren amb Nec durant 1h a les diferents concentracions indicades en les imatges i especificades com a concentracions de pre-tractament finals. Posteriorment al pre-tractament, Che s'afegí al medi de cultiu a una concentració final de 10 µM durant 24h. Els tractaments dels controls de Che, Nec i STP es realitzaren també durant 24h i emprant les concentracions respectives de 10 µM, 50 µM i 1 µM. L'anàlisi morfològic en les diferents condicions de tractament esmentades es dugué a terme mitjançant la tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33342. Les cèl·lules emmarcades s'exhibeixen en magnificacions ubicades al lateral de les imatges i la barra blanca indica 50 µm. (B) Anàlisi temporal del processament de caspasa-3 en les cèl·lules SH-SY5Y tractades amb 10 µM de Che o 50 µM de Nec o bé, pre-tractades amb 50 µM de Nec durant 1h i posteriorment tractades amb 10 µM de Che (indicat com a Nec + Che). Tots els tractaments es realitzaren als corresponents temps indicats. El processament de la caspasa-3 al seu fragment de pre-activació p20 i actiu p19 s'indica a la banda dreta del panell. La membrana emprada es tení amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes.



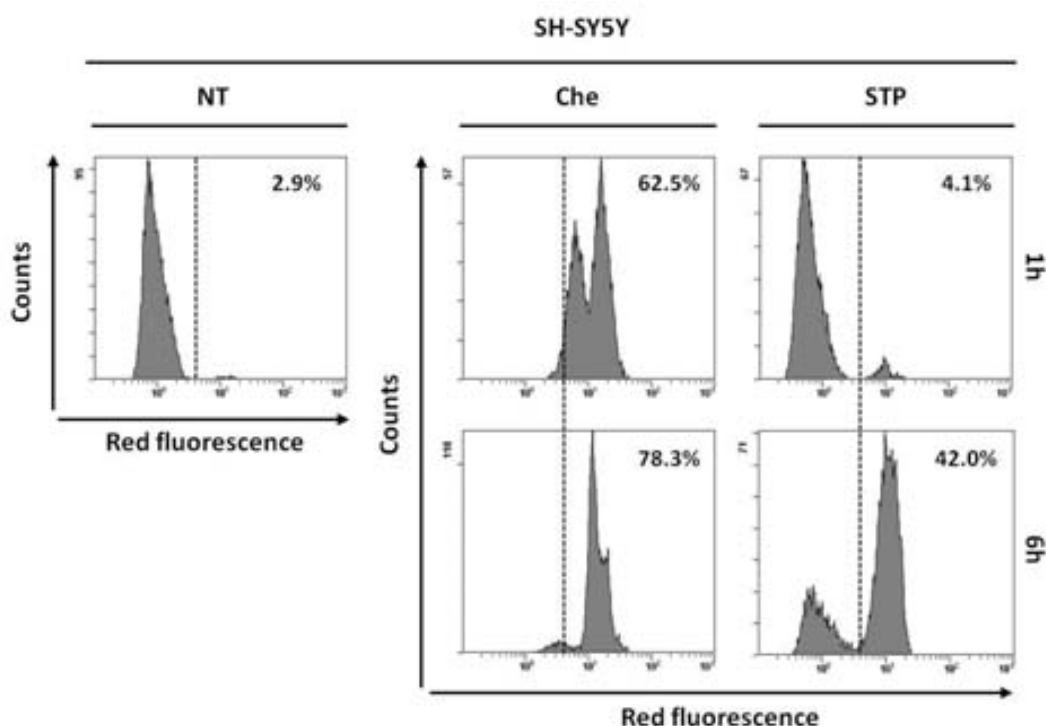
**Figura R23. Estudi de la protecció exercida pels antioxidants tiòlics en la mort cel·lular induïda per queleritrina.** (A) Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o bé, es pre-tractaren durant 1h amb antioxidants de tipus tiòlic (DTT, Me-GSH o NAC) o no tiòlic (AA, TCP o TRO) amb la posterior addició de Che al medi de cultiu (indicat com a + Che) a una concentració final 10  $\mu$ M durant 24h. Les concentracions finals de pre-tractament utilitzades pels diferents antioxidants van ser: 2 mM de DTT, 5 mM de GSH, 5 mM de NAC, 100  $\mu$ M d'AA, 1 mM de TCP o 100  $\mu$ M de TRO. A la banda dreta, s'obtingueren 50  $\mu$ g d'extractes totals de proteïna per analitzar el processament de caspasa-3 als seus fragments actius mitjançant la tècnica de *Western Blot*. La membrana emprada es tení amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes. A la banda esquerra, s'analitzà l'activitat de caspasa en les mateixes condicions de tractament es mentades a través de l'assaig d'activitat DEVDasa incubant durant 12h en el fluorímetre 20  $\mu$ g d'extractes de proteïna amb el substracte fluorogènic Ac-DEVD-afc. Els resultats d'activitat es van processar com a unitats arbitràries de fluorescència (A.U. fluorescence). (B) Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che i/o 20  $\mu$ M Q-VD-Oph (QVD) o 2 mM de DTT durant 1h de tractament o bé, es pre-tractaren durant 1h amb una concentració final de 2 mM de DTT amb la posterior addició al medi de cultiu de Che a una concentració final de 10  $\mu$ M durant també 1h. A continuació, s'analitzà la localització cel·lular de CAD a través d'un subfraccionament cel·lular en el que s'obtingueren la fracció citoplasmàtica (C fraction), la fracció nucleoplasmàtica (N1 fraction) i la fracció cromatínica (N2 fraction). L'anàlisi es realitzà mitjançant la tècnica de *Western Blot*. PKM2 i topoisomerasa I (*topoisomerase I*) s'empraren com a marcadors específics de les fraccions C i N2 respectivament.

### 19. L'addició de queleritrina al medi de cultiu provoca un increment intracel·lular d'espècies reactives de l'oxigen

Un cop establerts els processos d'estrès oxidatiu com a un factor clau en el desencadenament del procés de mort induït per queleritrina, vam decidir mesurar la quantitat d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). L'anàlisi es realitzà a 1 i 6 hores de tractament amb queleritrina i de forma comparativa a les cèl·lules tractades amb estaurosporina durant aquests

mateixos temps (Figura R24). Per fer-ho, la quantificació de les espècies reactives de l'oxigen es dugué a terme emprant la sonda DHE (*dihydroethidium*), l'oxidació de la qual implica la generació d'una senyal de fluorescència vermella que vam detectar a través de citometria de fluxe (Figura R24).

Tal i com s'observa en la figura R24, el tractament amb queleritrina durant 1 hora mostrà un elevat percentatge de cèl·lules productores de ROS (62,5%), mantenint-se fins a 6 hores. Estaurosporina, en canvi, malgrat va induir un percentatge de cèl·lules positives pels ROS del 42,0% a les 6 hores de tractament, no va arribar a provocar estrès oxidatiu durant la primera hora de tractament (Figura R24). Tot plegat, suggereix que la manifestació prematura detectada del fenotip de mort provocat per queleritrina coincideix amb la producció d'una elevada quantitat dels ROS detectada també de forma anticipada.



**Figura R24.** Queleritrina indueix una producció accentuada d'espècies reactives de l'oxigen en les cèl·lules SH-SY5Y. Anàlisi citomètric de la producció intracel·lular dels ROS utilitzant la sonda fluorescent DHE en cèl·lules SH-SY5Y no tractades (NT) o tractades amb 10  $\mu$ M de Che o 1  $\mu$ M de STP durant els temps indicats de tractament. Les dades citomètriques es van representar en histogrames que mostren el número d'esdeveniments cel·lulars (*counts*) en els eixos de les y, respecte a la intensitat de la senyal fluorescent vermella emesa per la sonda (*Red fluorescence*) i indicada en una escala logarítmica en els eixos de les x. La línia discontinua separa a la banda dreta la població de cèl·lules positives per la senyal fluorescent de la sonda i el percentatge d'aquestes cèl·lules s'indica en cada una de les diferents condicions de tractament.

## 20. El fenotip de mort induït per la queleritrina varia segons la concentració d'antioxidant tiòlic present al medi de cultiu

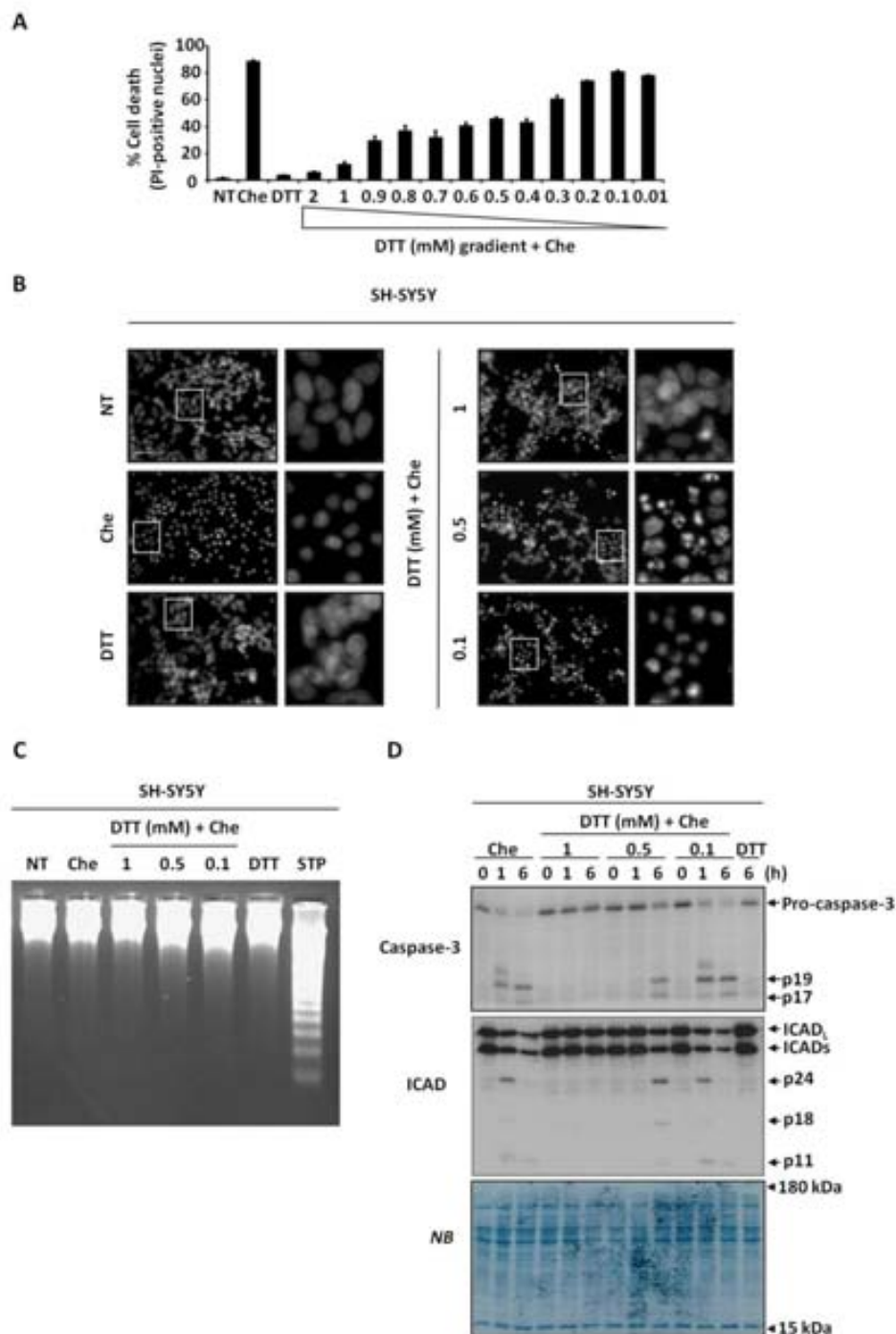
Per tal de seguir estudiant la implicació dels processos d'oxidació tiòlica en el procés de mort induït per queleritrina, primerament vam analitzar el perfil de mort desencadenat per aquest alcaloide emprant diferents concentracions de DTT (Figura R25A). En concret, es realitzaren pretractaments amb el DTT durant 1 hora i disminuint la concentració d'aquest de forma gradual desde la dosi amb la qual havíem detectat la protecció del procés de mort cel·lular provocat per

queleritrina (2 mM). Posteriorment, es van sotmetre les cèl·lules a un tractament de 6 hores amb aquest alcaloide.

Tal i com s'observa en la figura R25A, l'anàlisi de mort cel·lular realitzat mitjançant la tècnica de doble tinció nuclear amb PI i Hoechst mostrava una reducció aproximadament del 80% dels nivells de mort induïts per queleritrina en les concentracions de pre-tractament 2 i 1 mM de DTT. En aquestes concentracions, l'anàlisi morfològic revelava una protecció del fenotip nuclear no apoptòtic induït per queleritrina (Figura R25B). En concentracions de pre-tractament inferiors (de 0,9 a 0,4 mM) la protecció de la mort provocada per aquest alcaloide va ser parcial, ja que es van assolir percentatges de mort d'aproximadament d'entre el 30 i el 50% (Figura R25A). En aquestes concentracions, es detectà una morfologia apoptòtica de tipus II, manifestada de forma més predominant en les concentracions de pre-tractament d'entre 0,6 i 0,4 mM (en la figura R25B es mostra de forma representativa l'aparició d'aquesta morfologia a la concentració de pre-tractament 0,5 mM). Finalment, en les concentracions d'entre 0,3 i 0,01 mM, els nivells de mort induïts per queleritrina eren similars als detectats en el tractament individual d'aquest alcaloide (Figura R25A). La morfologia nuclear manifestada en aquests casos era de forma predominant de tipus no apoptòtic i amb un aspecte dels nuclis semblant a l'obtingut en el tractament amb queleritrina (veure la imatge representativa de la inducció d'aquesta morfologia en la dosi de pre-tractament de DTT de 0,1 mM mostrada en la figura R25B). Tot i així, cal esmentar que la concentració de 0,3 mM era una dosi intermitja entre les concentracions en les quals s'estava induint de forma predominant una morfologia apoptòtica tipus II i un fenotip nuclear no apoptòtic (imatges no mostrades).

Tenint en compte aquests resultats, vam voler analitzar tant la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN com l'activació de les caspases emprant diferents concentracions de pre-tractament amb DTT. En concret, s'utilitzaren les següents concentracions: 1 mM, la qual havia impedit el fenotip nuclear no apoptòtic induït per queleritrina; 0,5 mM, com a concentració representativa de la manifestació predominant de la morfologia apoptòtica tipus II; i 0,1 mM, com a la concentració en la qual el fenotip nuclear detectat era similar a l'induït per queleritrina (Figures R25B, R25C i R25D). Els dos anàlisis es realitzaren després de pre-tractar les cèl·lules amb les corresponents concentracions de DTT durant 1 hora i tractar-les posteriorment amb queleritrina durant 6 hores. Tal i com s'observa en la figura R25C, la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN no s'induí en cap de les concentracions de pre-tractament de DTT emprades, malgrat la presència de la morfologia apoptòtica de tipus II en la concentració de 0,5 mM (Figura R25B). Pel que fa a l'anàlisi d'activació de caspases, aquest es dugué a terme examinant tant el processament de caspasa-3 com el del seu substrate, ICAD, als seus respectius fragments mitjançant la tècnica de *Western Blot* (Figura R25D). Aquest anàlisi a part de realitzar-se a les 6 hores de tractament amb queleritrina, també s'efectuà al cap d'una hora de tractament amb aquest alcaloide per cada una de les diferents concentracions de pre-tractament de DTT esmentades anteriorment (Figura R25D). Tal i com mostra la figura R25D, tant el processament de caspasa-3 com el d'ICAD s'inhibien als dos temps de tractament (1h i 6h) amb queleritrina quan la concentració de pre-tractament amb DTT era la que impedia la manifestació del fenotip nuclear provocada per aquest alcaloide (1 mM) (Figura R25B). En canvi, en la concentració de pre-tractament en la qual detectàvem la morfologia apoptòtica tipus II (0,5 mM), l'activació de caspasa-3 i la proteòlisi d'ICAD es van observar a només 6 hores de tractament (Figures R25B i R25D). Per contra, el processament d'aquests dos components es detectava en els dos temps de tractament amb queleritrina i en presència de DTT a una concentració de 0,1 mM (Figura R25D). Cal remarcar que en aquest darrer cas de pre-tractament, la proteòlisi d'ICAD succeïa de forma similar a la mostrada en el tractament individual

amb queleritrina (Figura R25D). De fet, en aquestes dues condicions de tractament s'observà una detecció menys intensa del fragment p18 provinent de la proteòlisi d'ICAD-S respecte a la del fragment p24 d'ICAD-L (Figura R25D). A més, cal destacar que el fragment p18 es detectà de forma més accentuada en la concentració de pre-tractament 0,5 mM (Figura R25D). Tot plegat, indica que amb determinades concentracions de DTT al medi de cultiu, queleritrina indueix una morfologia apoptòtica de tipus II amb un retard de l'activació de les caspases. Tot i així, aquest fenotip de mort no va acompanyat d'una fragmentació oligonucleosomal de l'ADN.

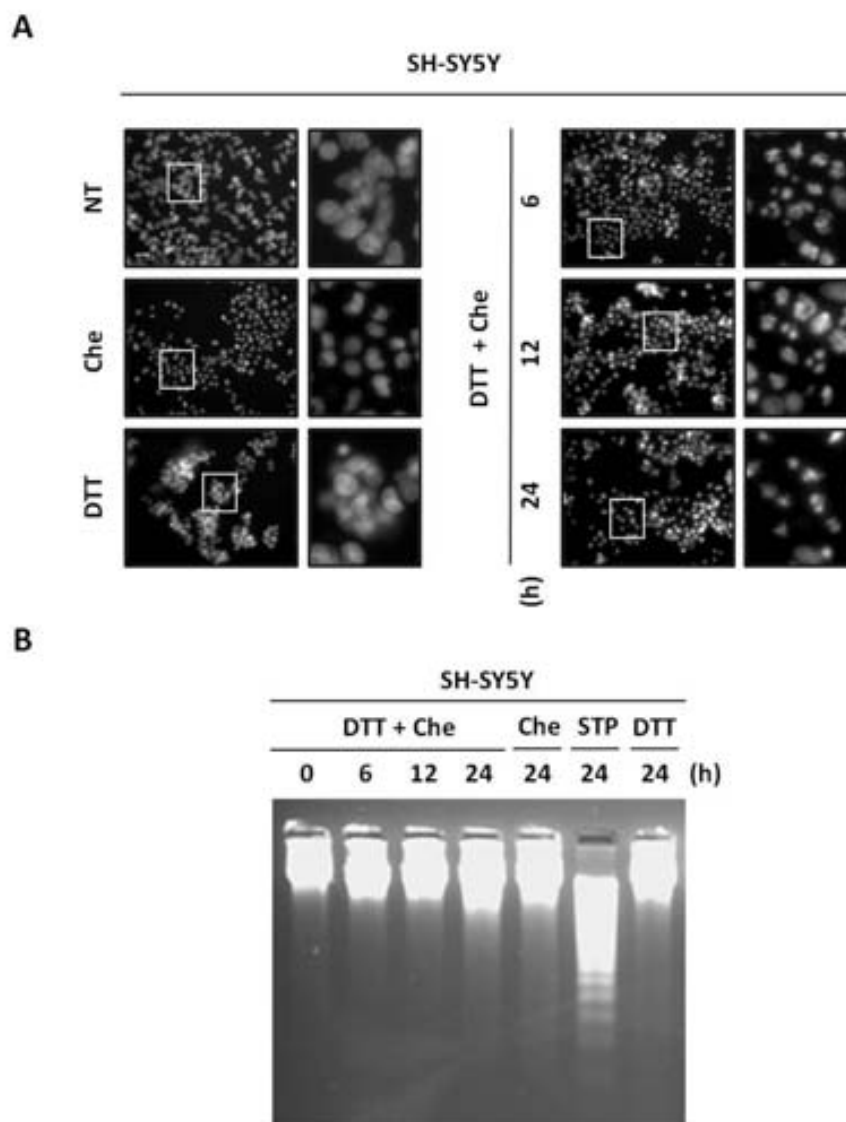


**Figura R25.** Queleritrina indueix un fenotip nuclear apoptòtic en absència de la degradació LMW de l'ADN quan determinades concentracions de DTT són presents al medi de cultiu. Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o 2 mM de DTT o bé, es pre-tractaren durant 1h amb les diferents concentracions

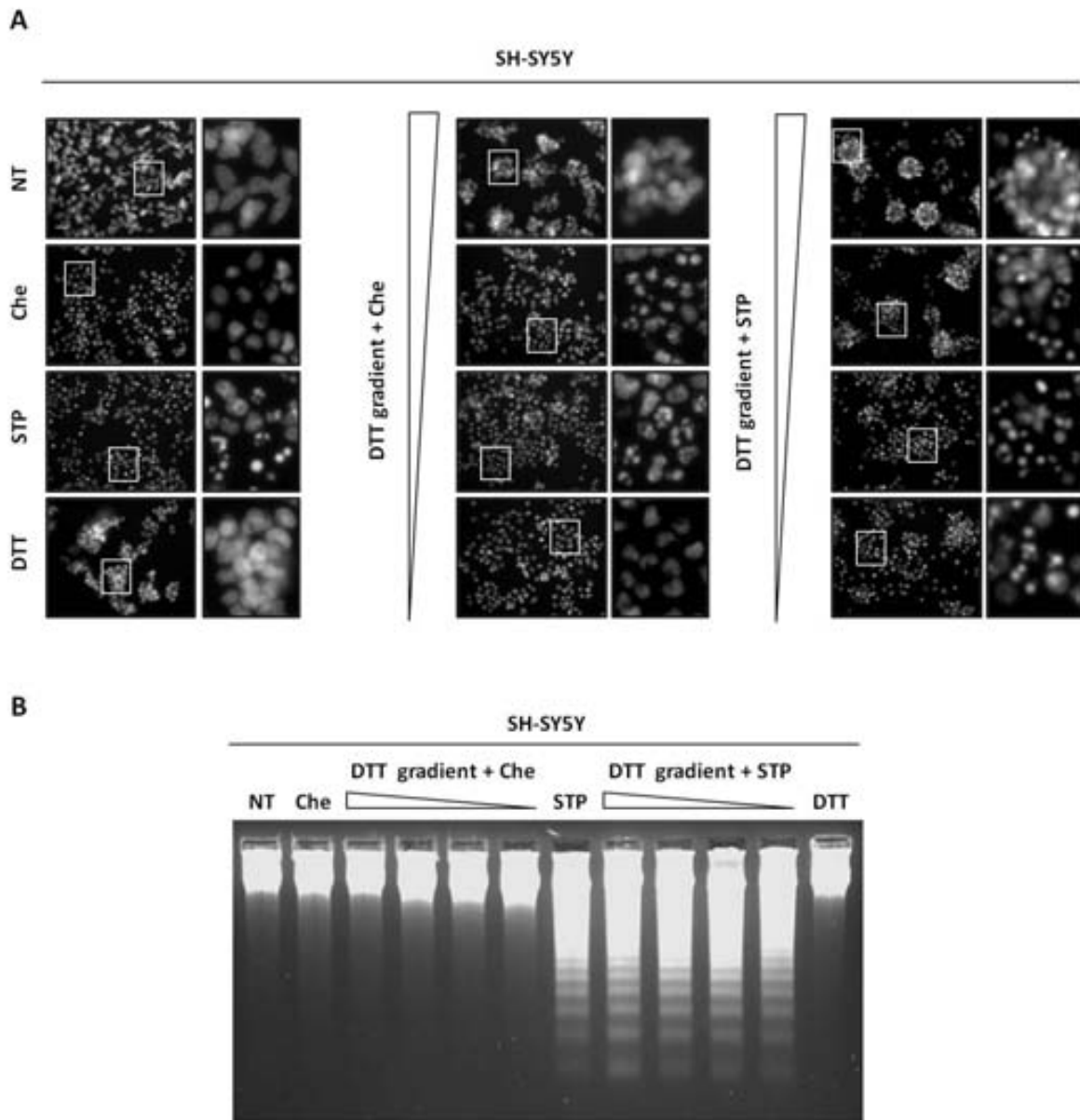
de DTT especificades en cada cas. Posteriorment, les cèl·lules es tractaren amb Che a una concentració final de 10  $\mu$ M durant 6 h de tractament. Les diferents concentracions de pre-tractament de DTT especificades es consideren com a concentracions finals i el triangle blanc indica un gradient d'aquestes partint de la concentració més gran utilitzada (2 mM) a la menor (0,01 mM). **(A)** Estudi de la mort cel·lular manifestada en cada una de les diferents condicions de tractament esmentades mitjançant el recompte de nuclis positius per la tinció amb PI respecte als totals tenyits per Hoechst 33342. **(B)** Anàlisi de la morfologia nuclear en les mateixes condicions de tractament especificades anteriorment però mostrant, en el cas de les diferents concentracions de pre-tractament de DTT, només el detall morfològic de les condicions indicades en les imatges (1 mM, 0.5 mM i 0.1 mM). L'anàlisi morfològic es realitzà mitjançant la tinció cel·lular amb Hoechst 33342 emprada en (A) i les cèl·lules emmarcades es magnifiquen al lateral de cada imatge. L'escala equival a 50  $\mu$ m. **(C)** Determinació de la fragmentació oligonucleosomal del DNA a través d'un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi en les mateixes condicions de tractament analitzades en (B). STP s'utilitzà a la concentració d'1  $\mu$ M durant 6 hores de tractament com a control positiu de fragmentació apoptòtica de l'ADN. **(D)** Estudi de l'activació de caspasa-3 i el seu substrate ICAD en les mateixes condicions de tractament analitzades en (B i C). El processament de caspasa-3 i ICAD als seus respectius fragments s'indica a la banda dreta del panell i l'anàlisi d'aquests es realitzà a 1 hora i a 6 hores de tractament per cada una de les condicions de tractament especificades. L'estudi es dugué a terme mitjançant la tècnica de *Western Blot* i la membrana emprada es tenyí amb NB (*naphthol blue*) per tal d'avaluar una càrrega equitativa de les proteïnes.

Per tal de corroborar aquestes darreres dades, vam decidir realitzar un estudi temporal de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN en diferents temps de tractament amb queleritrina, posteriors a les 6 hores, i emprant la concentració de pre-tractament de DTT en la qual s'estava induint la morfologia apoptòtica tipus II (0,5 mM) (Figura R26). D'aquesta manera, es pretenia descartar que l'absència d'aquesta degradació de l'ADN no fos deguda a un endarreriment de la seva aparició al llarg del temps. Tal i com s'observa en la figura R26B, la degradació LMW de l'ADN tampoc es detectà en els temps de tractaments posteriors a les 6 hores, malgrat l'anàlisi morfològic rebelava que a 12 i 24 hores les cèl·lules SH-SY5Y estaven manifestant una morfologia apoptòtica (Figura R26A). Aquests resultats, ens vam fer plantejar que potser el DTT estava inhibint de forma específica la inducció d'aquesta degradació de l'ADN, malgrat la morfologia apoptòtica es pogués arribar a manifestar. Per aquesta raó, vam decidir realitzar un altre estudi de la degradació LMW de l'ADN però després de sotmetre les cèl·lules SH-SY5Y a un pre-tractament d'una hora amb diferents concentracions de DTT i a un posterior tractament de 6 hores amb estaurosporina (Figura R27B). En paral·lel, a més, l'estudi es realitzà de forma comparativa en cèl·lules SH-SY5Y també pre-tractades amb diferents concentracions de DTT, però realitzant el posterior tractament de 6 hores amb queleritrina (Figura R27B). Com es pot veure en la figura R28B, la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN es manifestà en totes les cèl·lules en les quals s'havia afegit estaurosporina al medi de cultiu i, per tant, de forma independent a la concentració de pre-tractament de DTT emprada. Inclús, en la major concentració de pre-tractament amb DTT utilitzada en el tractament amb estaurosporina, la degradació LMW de l'ADN tampoc no s'inhibia (Figura R27). A més, cal tenir present que en aquestes mateixes condicions l'anàlisi morfològic rebelava un major efecte de protecció de la morfologia apoptòtica d'estaurosporina i, en conseqüència, una menor presència dels nuclis apoptòtics induïts per aquest compost (Figura R27). Tot i així, cal remarcar que malgrat la morfologia nuclear induïda per queleritrina en presència de determinades concentracions de DTT pogués arribar a ser apoptòtica de tipus II, la manifestació d'aquesta tendia a donar-se en coexistència amb altres tipus de fenotips nuclears tant apoptòtics com no apoptòtics (Figures R25B, R26A i R27A).





**Figura R26. Anàlisi de la inducció dels hallmarks apoptòtics en diferents temps de tractament de queleritrina en presència de DTT.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che o 0,5 mM de DTT o bé, es pre-tractaren durant 1h amb DTT a una concentració final de 0.5 mM. Posteriorment al pre-tractament, Che s'afegí al medi de cultiu a una concentració final de 10  $\mu$ M (indicat com a DTT + Che) durant els temps de tractament especificats en cada cas. **(A)** Anàlisi morfològic mitjançant la tinció amb Hoechst 33258. Les cèl·lules enquadrades es mostren en magnificacions situades al lateral de les imatges. L'escala indica 50  $\mu$ m. **(B)** Estudi temporal de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN en les condicions de tractament esmentades mitjançant una electroforesi en un gel convencional d'agarosa i la posterior tinció amb bromur d'etidi. STP s'utilitzà a la concentració d'1  $\mu$ M durant 6 hores de tractament com a control positiu d'inducció de la fragmentació apoptòtica de l'ADN.

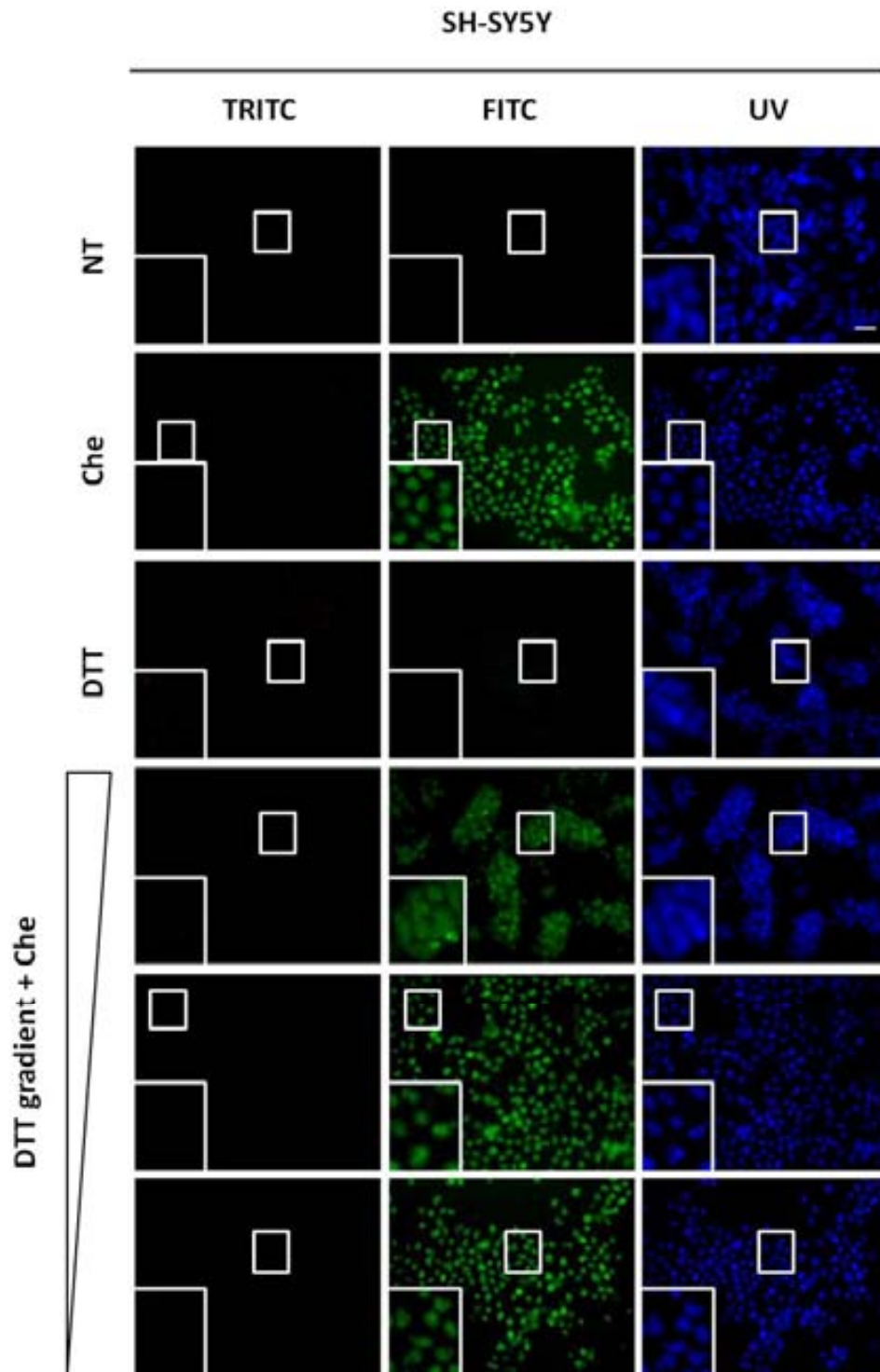


**Figura R27. Estudi de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN induïda per estauroporina en presència de DTT.** Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10  $\mu$ M de Che, 1  $\mu$ M de STP o 2 mM de DTT o bé, es pre-tractaren durant 1h emprant un gradient de diferents concentracions de DTT (indicat com a un triangle blanc des de la major concentració a la menor). Posteriorment al pre-tractament, Che o STP s'afegiren al medi de cultiu a les respectives concentracions finals de 10  $\mu$ M i 1  $\mu$ M durant 6 hores de tractament (indicat com a DTT gradient + Che o DTT gradient + STP respectivament). Les concentracions finals de DTT emprades en els diferents pre-tractaments van ser: 1 mM, 0,5 mM, 0,3 mM i 0,1 mM en el cas del gradient de DTT amb Che; 2 mM, 1 mM, 0,5 mM i 0,1 mM pel gradient de DTT amb STP. **(A)** Anàlisi de la morfologia nuclear en les condicions de tractament esmentades mitjançant la tinció amb Hoechst 33258. Les magnificacions mostren les cèl·lules enquadrades al lateral de les diferents imatges. La barra blanca indica 50  $\mu$ m. **(B)** Determinació de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN en les diferents condicions de tractament especificades a través d'un gel convencional d'agarosa i de la posterior tinció amb bromur d'etidi.

En conjunt, tots aquests resultats suggerien que la inhibició de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN en el fenotip de mort induït per queleritrina s'associava a altres causes diferents dels processos d'oxidació tiòlica. Tenint en compte aquestes dades i que prèviament havíem detectat un efecte intercalant en l'ADN per part de queleritrina (Figura R19), vam procedir a analitzar si aquest efecte s'estava manifestant en les cèl·lules tractades amb aquest alcaloide en les quals el pre-tractament amb DTT restablia la morfologia apoptòtica tipus II però no la

fragmentació oligonucleosomal de l'ADN. Aquest estudi, a més, es realitzà de forma comparativa en les cèl·lules que havien estat tractades amb queleritrina en presència tant d'una concentració de DTT més gran que la que permetia la inducció de la morfologia apoptòtica i que aconseguia evitar el fenotip nuclear induït per queleritrina, com d'una altra més inferior en la qual l'aspecte dels nuclis no era apoptòtic (Figura R28). Per fer-ho, es dugué a terme un anàlisi morfològic a través dels diferents filtres de fluorescència TRITC, FITC i UV, després de realitzar una tinció amb Hoechst 33258. Com era d'esperar, la tinció amb Hoechst ens va permetre visualitzar l'aspecte dels nuclis a través del filtre de UV en les diferents condicions de tractament (Figura R28). En canvi, en tots els tractaments en els quals s'havia afegit queleritrina al medi de cultiu, l'aspecte dels nuclis també es detectava en el filtre de FITC (Figura R28). Aquest fet concordava amb la capacitat de queleritrina d'emetre una senyal de fluorescència (amb un espectre d'emissió entre les  $\lambda$  de 500 i 625 nm) detectable en el filtre de FITC, després d'unir-se a l'ADN i excitar-se a una  $\lambda$  (488 nm) inclosa en el pas de banda d'aquest filtre (amb un pas de banda de  $\lambda_{\text{excitació}}$  entre 465-495 nm i de  $\lambda_{\text{emissió}}$  entre 515-555 nm) (Liu, Liu et al. 2006). Tot plegat, suggeria que les propietats intercalants sobre l'ADN manifestades per queleritrina, també es mantenien en les condicions de pre-tractament de DTT en les quals s'estava induint la morfologia apoptòtica però no la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN.

En resum, el conjunt de resultats exposats indiquen que el reestabliment del fenotip nuclear apoptòtic en cèl·lules tractades amb queleritrina en presència de determinades concentracions d'un antioxidant tiòlic es pot relacionar amb una inhibició de l'activació prematura de les caspases. Per altra banda, el conjunt de les dades també permet considerar que la manca de la degradació oligonucleosomal de l'ADN es deu a mecanismes diferents dels que estan induint el fenotip nuclear no apoptòtic detectat en el procés de mort desencadenat per queleritrina i, a més a més, apunten a l'efecte intercalant de l'ADN com a una de les possibles causes responsables de l'absència d'aquesta fragmentació apoptòtica de la cromatina.



**Figura R28.** Anàlisi de les propietats d'unió a l'ADN de queleritrina en presència de DTT. Les cèl·lules SH-SY5Y es deixaren sense tractar (NT) o es tractaren amb 10 µM de Che o 1 mM de DTT o bé, es pre-tractaren durant 1h amb DTT utilitzant un gradient de diferents concentracions (1 mM, 0,5 mM o 0,1 mM), el qual s'indica en forma de triangle blanc des de la major concentració de l'antioxidant emprada a la menor. Les concentracions de pre-tractament de DTT s'especificuen com a concentracions finals. Posteriorment al pre-tractament, les cèl·lules es tractaren amb Che a una concentració final de 10 µM durant 6h de tractament (indicat com a DTT gradient + Che). Les propietats d'unió a l'ADN de queleritrina es determinaren mitjançant un anàlisi morfològic per tinció de les cèl·lules amb Hoechst 33258 i la posterior visualització de l'aspecte dels nuclis a través dels filtres de fluorescència: TRITC, d'emissió de fluorescència vermella; FITC pel d'emissió de fluorescència verda; i UV com al canal d'emissió de fluorescència blava, amb el qual es detectaren els nuclis tenyits per Hoechst 33258. Les cèl·lules enquadrades es mostren en magnificacions situades a la part inferior dreta de cada imatge. La barra blanca equival a 50 µm.

## **VII. DISCUSSIÓ**





## 1. Rellevància de l'estudi de nous processos de mort cel·lulars en cèl·lules malignes: caracterització del model de mort induït per queleritrina

Des d'un punt de vista clàssic, s'ha distingit entre la mort apoptòtica, amb una implicació principalment fisiològica, i la mort necròtica, lligada a un context patològic. No obstant, l'estudi sobre les diferents modalitats de mort cel·lular ha permès determinar que no tota mort fisiològica és de caire apoptòtic, ni que tota mort patològica és de tipus necròtic (Thompson 1995; Han, Kim et al. 2008). A més a més, la recerca sobre els processos de mort cel·lular ha demostrat l'existència d'una gran varietat de noves modalitats de mort (Galluzzi, Vitale et al. 2012). És més, alguns d'aquests nous processos de mort no solament estan lligats a un context patològic, sinó que també s'han associat dins d'un marc fisiològic (Marino and Lopez-Otin 2004).

Malgrat l'avanç en el coneixement de les noves modalitats de mort cel·lular, la mort apoptòtica continua sent el principal tipus de mort estudiada i associada als processos de destrucció tumorals (Houghton 1999). La inducció d'apoptosi en cèl·lules malignes es descriu en la literatura per ser la principal resposta cel·lular en front a una àmplia varietat d'agents quimioteràpics (Wong 2011; Taylor, Micha et al. 2006). És més, la inducció de la mort apoptòtica com a principal mecanisme de mort, no solament s'atribueix a estudis fets *in cellula*, sinó que també es manifesta *in vivo* (Houghton 1999). Així, per exemple, nombrosos agents quimioteràpics, com la citarabina, la mitoxantrona, l'etopòsid, el paclitaxel i el topotecan, causen un increment considerable en el número de cèl·lules apoptòtiques en cèl·lules extretes de pacients afectats per diferents tipus de leucèmia (Li, Gong et al. 1994). De la mateixa manera, també s'observen característiques apoptòtiques en cèl·lules de tumors de ratolí després del tractament amb varis agents citotòxics, com ara la citarabina, el 5-fluoroacil, la fludarabina, la doxorubicina, la ciclofosfamida, el cisplatí, l'etopòsid, la dactinomicina i la camptotecina (Mesner, Budihardjo et al. 1997). No obstant, l'anàlisi de la modalitat de mort apoptòtica en el context clínic és sovint escassa o incompleta pel que fa sobretot a l'estudi dels *hallmarks* apoptòtics i, a més, no es té present la possibilitat d'induir la mort de les cèl·lules tumorals de forma diferent a l'apoptòtica.

Amb el propòsit d'aprofundir en l'estudi d'altres processos de mort cel·lular que puguin co-existir amb l'apoptosi, vam decidir utilitzar com a model cel·lular les cèl·lules SH-SY5Y, derivades de neuroblastoma humà, que van ser sotmeses a diferents insults citotòxics. Un primer anàlisi morfològic dels nuclis de les cèl·lules tractades revela que l'aspecte d'aquests resulta diferent dins d'una mateixa població cel·lular. Els casos més remarcables s'observen quan les cèl·lules es tracten amb rotenona, camptotecina, etopòsid, oxaliplatí, colxicina, nocodazol o thapsigargina. La majoria dels tractaments utilitzats provoquen heterogeneïtat en l'aspecte dels nuclis, però el tractament amb estaurosporina o queleritrina resulta més homogeni, sent la majoria dels nuclis, apoptòtics en el cas d'estaurosporina, o no apoptòtics en el cas de queleritrina. En aquest sentit, l'estudi de la mort cel·lular induïda per queleritrina resulta una important estratègia per l'anàlisi dels mecanismes responsables d'un procés que no finalitza amb la manifestació clàssica d'un fenotip nuclear apoptòtic.

El fenotip de mort induït per queleritrina resulta encara més interessant si es té en compte que aquest es desencadena independentment de la concentració emprada. De fet, els nostres resultats demostren que sempre que queleritrina indueix citotoxicitat, el fenotip nuclear observat no adquireix les característiques apoptòtiques. Aquest fet és de gran rellevància, donat que es coneix que la majoria de quimioteràpics actuals són capaços d'induir diferents fenotips de mort en funció de la quantitat de fàrmac que arriba a la cèl·lula tumoral (Orrenius, Nicotera et al. 2010). Per

exemple, tant *in vivo* com *in cellula*, baixes concentracions d'un inductor de mort poden desencadenar un fenotip apoptòtic, mentre que concentracions més altes del mateix estímul poden arribar a provocar una mort de tipus necròtica (Gillespie, Zhang et al. 2004; Saito, Nishio et al. 2006). No obstant, cal afegir que l'acció d'un fàrmac quimioteràpic en concret també es pot veure afectada per les particularitats tant fisiològiques com estructurals de la zona de l'organisme tractada. Un exemple és la toxicitat renal induïda de forma diferencial pel cisplatí. Aquest compost induïx una mort cel·lular amb característiques principalment apoptòtiques en el túbul distal, i una població de mort heterogènia d'apoptosi i necrosi en el túbul proximal. El major grau de reabsorció que es dona en el túbul proximal afavoreix a una major captació del quimioteràpic en aquesta zona (Sancho-Martinez, Piedrafita et al. 2011). D'altra banda, la concentració de l'agent citotòxic alliberada en la zona afectada no és l'únic factor determinant per l'execució d'un tipus de mort o altre. El mode d'acció dels agents citotòxics es pot relacionar també amb factors tant fisiològics com patològics. Així, per exemple, una reducció en els nivells d'ATP, o bé la inducció d'un estrès oxidatiu que supera un determinat llindar, pot portar a què un mateix estímul apoptòtic acabi provocant una mort cel·lular de tipus necròtica (Nicotera and Melino 2004; Troyano, Sancho et al. 2003). Inclús, ja dins d'un aspecte patològic, s'ha observat que un defecte en l'activació de la maquinària apoptòtica pot permetre el desencadenament de la mort necròtica (Zhang, Hao et al. 2008). En el nostre cas, cal dir que arribem a relacionar l'efecte d'un d'aquests factors amb el fenotip nuclear de mort induït. En concret, detectem que la manifestació del fenotip de mort no apoptòtic induït per queleritrina coincideix amb la presència de cèl·lules que estan patint un procés d'estrès oxidatiu. A més, segons la concentració d'un antioxidant tiòlic present al medi de cultiu, les cèl·lules tractades amb queleritrina mostren una morfologia nuclear apoptòtica. Per altra banda, cal afegir que la morfologia nuclear apoptòtica es manifesta en presència d'altres fenotips de mort. És a dir, estem davant d'un model de citotoxicitat que no solament ens pot aportar informació rellevant sobre els mecanismes implicats en un fenotip de mort no apoptòtica, sinó que també pot contribuir a entendre la presència de diferents fenotips de mort que co-existeixen dins d'una mateixa població cel·lular sotmesa a un estímul de mort. Aquest fet té una gran rellevància terapèutica donat els múltiples factors fisiològics i/o patològics de l'organisme que poden arribar a alterar el fenotip final de mort induït per un agent quimioteràpic en particular.

Continuant amb el fenotip de mort cel·lular induït per queleritrina, aquest no solament es caracteritza per l'absència de la morfologia apoptòtica clàssica, sinó que les cèl·lules tractades amb l'alcaloide també mostren una incapacitat per degradar el seu material genètic, almenys de forma oligonucleosomal. Existeixen altres models de neuroblastoma defectuosos en una inducció parcial o completa dels *hallmarks* apoptòtics. Així, per exemple, diverses línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà, com és el cas de les cèl·lules SH-SY5Y, SK-N-SH, LAN-1 i SK-N-Be(2), manifesten tant la morfologia nuclear apoptòtica clàssica com la degradació oligonucleosomal de l'ADN, després de ser tractades amb diferents insults (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2012). Altres, en canvi, no mostren la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN i manifesten una morfologia de tipus I, com és el cas de les cèl·lules IMR-5, IMR-32 i LA1-5S (Boix, Llecha et al. 1997; Yuste, Bayascas et al. 2001; Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2012). Finalment, existeix un altre tipus de resposta citotòxica observada en les cèl·lules SK-N-AS, les quals mostren una morfologia nuclear apoptòtica clàssica però són defectives per degradar la seva cromatina en fragments oligonucleosomals (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2012). En qualsevol cas, el procés de mort induït per queleritrina és el primer que reproduïx un fenotip de mort sense una morfologia nuclear apoptòtica i una degradació oligonucleosomal de l'ADN i, a més a més, depenent de l'activació de les caspases, la principal maquinària molecular apoptòtica. A més, es fa necessari apuntar que el fenotip nuclear provocat per queleritrina es manifesta en una línia



cel·lular, com són les cèl·lules SH-SY5Y, les quals, després d'un insult, experimenten, principalment, mort cel·lular apoptòtica de forma completa. Cal remarcar que queleritrina també indueix el fenotip nuclear no apoptòtic en la resta de línies cel·lulars emprades. Aquest fet resulta quelcom més considerable si es té present que totes aquestes línies cel·lulars derivades de neuroblastoma presenten diferents tipus de fenotips de mort després de tractar-se amb el mateix estímul apoptòtic com, per exemple, l'estaurosporina (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2012). La rellevància d'aquesta dada deriva del fet que el 30% dels neuroblastomes a l'ésser humà pateixen una deleció en la part distal de la regió telomèrica del braç curt del cromosoma 1 (1p36.3), en la qual es troba localitzat el gen de CAD (Mukae, Enari et al. 1998). De fet, l'extensió i el tipus de deleció d'aquesta regió cromosòmica és diferent segons la línia cel·lular de neuroblastoma i acaba implicant que aquestes cèl·lules posseeixin dues o una única còpia de CAD (Van Roy, Jauch et al. 1997). Per tant, els diferents tipus d'alteracions cromosòmiques en aquesta regió podrien explicar les diferències d'inducció del fenotip apoptòtic a nivell morfològic i bioquímic d'aquestes línies sota l'estímul d'estaurosporina, però no la manifestació del mateix fenotip de mort en totes aquestes línies de neuroblastoma després de ser tractades amb queleritrina. Tenint en compte aquestes dades, podríem considerar que aquest fenotip de mort no és depenent de CAD. Tot i així, no podem excloure el sistema ICAD·CAD en el procés de mort induït per queleritrina perquè detectem la translocació de CAD a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb aquest alcaloide (la implicació del sistema ICAD·CAD s'analitza més endavant en l'apartat 3. de la discussió).

En resum, els nostres resultats apunten el procés de mort induït per queleritrina com a una bona estratègia per l'estudi dels mecanismes implicats tant en nous processos de mort diferents de l'apoptòtic canònic, com per aquells que es caracteritzen per manifestar fenotips nuclears apoptòtics co-existents amb d'altres processos de mort. Per tant, el fet de poder estudiar la implicació de les caspases i el sistema ICAD·CAD en cèl·lules que adquireixen un fenotip nuclear no apoptòtic de forma homogènia i en les cèl·lules que, en canvi, mostren un procés de mort apoptòtic heterogeni, podria ser determinant per la comprensió dels processos de mort cel·lular que finalitzin amb aquestes característiques.

## **2. Estudi de les causes de l'activació prematura de les caspases en la manifestació d'un fenotip de mort necròtic**

Una de les dades més rellevants que veiem en el procés de mort induït per queleritrina és que la manifestació del fenotip nuclear no apoptòtic no solament es mostra de forma depenent de caspases, sinó que es manifesta de forma anticipada i coincidint amb una activació prematura d'aquestes. En aquest sentit, podríem pensar que l'activació de caspases és un efecte colateral d'aquest procés de mort, donat que el fenotip nuclear manifestat no és apoptòtic. No obstant, l'execució del sistema de caspases és determinant i després d'un anàlisi més exhaustiu de com s'està produint aquesta activació mostrem que la manifestació d'aquest fenotip nuclear requereix de fet, l'activació prematura de les caspases observada. És per això que primerament es discutiran les possibles causes que poden ser responsables de l'activació anticipada de les caspases i, posteriorment, sobre el fet de considerar el fenotip de mort no apoptòtic provocat per queleritrina com a necròtic.

Una de les raons que podria explicar l'activació prematura de les caspases, és una sortida anticipada dels factors mitocondrials pro-apoptogènics al citosol prou potent com per desencadenar aquest fenomen. Els nostres resultats mostren que queleritrina indueix una forta sortida de citocrom

c i Smac/DIABLO a la fracció citoplasmàtica, en comparació amb estaurosporina. En el cas de citocrom c, els alts nivells d'activació de caspases induïts per queleritrina es podrien explicar per la sortida d'una gran quantitat de molècules de citocrom c al citoplasma. Un increment en la formació de plataformes apoptosòmiques s'acabaria traduint en una major activació de les caspases efectores. De fet, alguns treballs esmenten el potent efecte inductor de mort cel·lular d'aquest factor mitocondrial, donat que detecten que la sobreexpressió de citocrom c accelera la inducció de la mort apoptòtica (Okazaki, Ishibashi et al. 1998). La hipòtesi que una sortida de citocrom c prematura pugui afavorir el desencadenament d'una activitat anticipada de les caspases, es recolza per varis estudis. En concret, cal destacar un treball de Hampton i col·laboradors on es mostra una sortida de citocrom c a tan sols 5 minuts de tractament amb l'estímul citotòxic, que precedeix a una activitat de caspases detectada a 1h (Stridh, Kimland et al. 1998). La detecció d'aquesta es produeix amb un increment abrupte dels valors d'activitat de manera molt semblant al que nosaltres veiem amb queleritrina. Aquest fet ens reforça encara més, el possible vincle d'una sortida de citocrom c prematura amb l'assoliment dels alts nivells d'activitat de caspases induïts de forma anticipada per queleritrina, respecte als que observem en el tractament amb estaurosporina. De fet, un altre treball sustenta encara més aquesta hipòtesi, donat que els autors, emprant el mateix estímul de queleritrina, arriben a detectar una sortida de citocrom c anticipada i que, a més, coincideix amb l'activació de caspasa-3 a una hora de tractament (Vogler, Weber et al. 2009).

Per altra banda, cal recordar que citocrom c no és l'únic factor mitocondrial que podria ser clau en el desencadenament dels alts nivells d'activació de caspases induïts de forma anticipada per queleritrina, respecte als detectats durant el tractament amb estaurosporina. Smac/DIABLO també es detecta en major grau en la fracció citoplasmàtica de les cèl·lules tractades amb queleritrina en comparació a les de l'estaurosporina. Aquest factor mitocondrial es caracteritza per promoure l'activació de les caspases mitjançant la inhibició de les IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*), les quals, cal recordar, actuen com a inhibidors de les caspases (Verhagen, Ekert et al. 2000). En aquest sentit, una major quantitat de molècules de Smac/DIABLO al citoplasma de les cèl·lules tractades amb queleritrina, podria contribuir a la inducció prematura dels alts nivells d'activació de caspases que detectem després del tractament amb l'alcaloide, respecte als observats amb l'estaurosporina. De fet, s'ha vist que la sobreexpressió de Smac/DIABLO incrementa la sensibilitat de les cèl·lules als estímuls apoptòtics promovent una major activació de les caspases (Du, Fang et al. 2000; Hunter, Kottachchi et al. 2003).

Una vegada analitzada la sortida mitocondrial tant de citocrom c com de Smac/DIABLO en la inducció d'una activació prematura de les caspases, cal discutir sobre els possibles esdeveniments previs que poden estar succeint a la mitocòndria i ser, per tant, determinants en l'execució d'aquest mecanisme. Part dels nostres resultats apunten a considerar les espècies reactives de l'oxigen (ROS) com la causa més probable de la inducció d'una activació anticipada de les caspases. Així, l'activació de les caspases que detectem a una hora de tractament amb queleritrina coincideix amb una producció intracel·lular de ROS. A més, establim que l'addició de diferents antioxidants tiòlics al medi de cultiu inhibeix la mort cel·lular i l'activació de caspases desencadenats per l'alcaloide. Aquestes dades determinen els processos d'estrès oxidatiu com a un factor clau en l'execució d'aquest tipus de mort. La dada més sorprenent, però, és que veiem que una determinada concentració d'un d'aquests agents antioxidants al medi de cultiu endarrereix l'activació de les caspases induïda per queleritrina. És a dir, establim que el dany oxidatiu dels ROS a nivell de proteïnes és determinant pel desencadenament d'una activació anticipada de les caspases. En aquest sentit, podríem suggerir que la quantitat de ROS detectada a una hora de tractament amb queleritrina podria estar induint un dany oxidatiu a la mitocòndria de forma

anticipada i prou considerable com per contribuir a una sortida prematura dels factors mitocondrials cap al citosol, pel que aquesta sèrie d'esdeveniments podrien explicar l'activació anticipada de les caspases. A més a més, l'efecte de dany oxidatiu per una excessiva producció intracel·lular de ROS és una de les senyals d'estrès mitocondrial que porten a una permeabilització de la membrana mitocondrial (Orrenius 2007). Tot i que en el procés de mort induït per queleritrina, no hem avaluat el mecanisme específic d'aquesta permeabilització, podríem suggerir una pèrdua del control de la permeabilitat mitocondrial per part del porus PTPC (*permeability transition pore complex*) (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). En concret, l'oxidació de tiols de components proteïcs del porus, com el translocador d'adenina trifosfat ANT, porta a una sèrie de canvis conformacionals que acaben conduint a una disfunció del porus PTPC i al consegüent increment de permeabilitat mitocondrial (Costantini, Belzacq et al. 2000). Inclús, s'ha vist l'efecte de prevenció de l'agent reductor DTT en un procés de permeabilització de la membrana mitocondrial induït per un dany oxidatiu tiòlic (Valle, Fagian et al. 1993). Cal recordar que en el procés de mort cel·lular induït per queleritrina, la protecció antioxidant s'exerceix només a nivell d'antioxidants de tipus tiòlic. Tenint en compte aquesta dada, la inducció de la permeabilització mitocondrial per part de queleritrina es podria deure a una disfunció del porus PTPC per una oxidació d'alguns dels seus components proteïcs. A més a més, aquesta idea encara es recolza més si es té en compte que s'ha vist que ciclosporina A, un inhibidor del porus PTPC, evita la despolarització de la membrana mitocondrial induïda per queleritrina (Wan, Chan et al. 2008). Per altra banda, detectem que els antioxidants amb un major efecte de prevenció en la oxidació dels lípids no impedeixen ni la mort cel·lular ni l'activació de caspases desencadenades per l'alcaloide. Tot i així, els nivells d'activitat de caspasa induïts per queleritrina són menors en presència d'aquests oxidants en comparació als detectats en el tractament individual de l'alcaloide. És més, la baixada de la pro-forma de caspasa-3 en les condicions de pre-tractament amb els antioxidants no tiòlics no és comparable a la detectada en el tractament individual amb queleritrina. Aquest fet remarca encara més la implicació de ROS en el procés de mort induït per l'alcaloide i estableix l'oxidació tiòlica com a un factor determinant per la realització d'aquest.

Cal afegir que, si continuem considerant la hipòtesi del dany mitocondrial per l'efecte de ROS, aquesta idea es recolza pel fet que varis treballs detecten un dany mitocondrial en processos de mort induïts per l'alcaloide (Vogler, Weber et al. 2009; Wan, Chan et al. 2008). En el treball de Wan i col·laboradors, els autors especifiquen que queleritrina provoca un inflament de la mitocòndria (Wan, Chan et al. 2008). Inclús, un altre treball, per imatges de microscopia electrònica, revela un dany mitocondrial induït per queleritrina basat no solament per l'inflament de l'orgànul, sinó per la presència d'inclusions de fosfolípids (Vogler, Weber et al. 2009). Pel que fa als nostres resultats, no hem avaluat de forma directa el dany mitocondrial però detectem una alteració considerable del metabolisme cel·lular (observat a partir del potencial reductor de la cèl·lula a través de l'assaig MTT) de forma prematura durant el tractament de queleritrina i més potent que en les cèl·lules tractades amb estaurosporina. A més a més, en vàries imatges de microscopia electrònica apreciem una condensació substancial de les mitocòndries després del tractament de 6h amb queleritrina (dada no mostrada). A 24h de tractament, l'enorme desintegració cel·lular no permet fer una valoració d'aquest fet en aquest anàlisi morfològic. No obstant, cal remarcar que el Q-VD-OPh no és capaç d'evitar l'estat de condensació de les mitocòndries induït per queleritrina. Tot plegat, ens suggereix la inducció d'un dany mitocondrial en el procés de mort induït per queleritrina i que, almenys a nivell morfològic, sembla ser independent de caspases.

Per altra banda, cal esmentar que les caspases mantenen un llindar d'activació malgrat la presència dels ROS. Les caspases són susceptibles d'inactivar-se per una oxidació tiòlica al seu

centre actiu. Varis estudis abalen l'execució d'una mort apoptòtica amb les caspases actives sota un nivell baix d'estrès oxidatiu, i la d'una mort necròtica, amb les proteases inactives, quan la producció de ROS és major (Dyrbukt, Ankarcróna et al. 1994; Hampton and Orrenius 1997; Saito, Nishio et al. 2006). En el nostre cas, detectem un elevat percentatge de cèl·lules que estan patint estrès oxidatiu però podria ser que el lliandar de ROS induït en aquestes cèl·lules, no fos suficient com per realitzar una inactivació oxidativa de les caspases. Una altra hipòtesi respecte al manteniment de l'activitat de caspases en presència dels ROS, podria ser que l'alliberament de citocrom c i Smac/DIABLO fos tant potent i determinant pel desencadenament de l'activació de caspases, que els ROS no fossin capaços d'induir un efecte d'inactivació oxidativa en les proteases. Des d'aquest punt de vista, resulta interessant remarcar un treball de Wan i col·laboradors en el què detecten una sortida de citocrom c a partir de la primera mitja hora de tractament amb queleritrina, tant en cèl·lules MEF wt (*wild type*) com en les DKO de Bax i Bak (Wan, Chan et al. 2008). Tot i que els autors no donen la suficient rellevància a aquests esdeveniments, detecten que la sortida de citocrom c coincideix amb un increment dels nivells intracel·lulars de ROS i activitat de caspases. No obstant, el conjunt de les seves dades recolza la nostra hipòtesi sobre el fet que una sortida de citocrom c al citosol estigui estimulant una activitat de caspases tant potent, que no pugui ser suprimida per la quantitat de ROS generada.

Una altra possible causa de la inducció de l'activació prematura de les caspases que ens hem plantejat, és l'efecte intercalant sobre l'ADN detectat en el tractament amb queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y. Els nostres resultats mostren que els diferents agents d'unió a l'ADN testats, ja siguin amb propietats intercalants i/o amb capacitat d'unir-se als solcs de l'ADN, impedeixen la manifestació dels *hallmarks* apoptòtics en les cèl·lules SH-SY5Y i posen de manifest un fenotip nuclear similar al provocat per queleritrina (aquest punt s'analitza més àmpliament en l'apartat 7.3). Aquestes similituds ens porten al plantejament que potser és l'efecte d'unió a l'ADN la raó per la qual s'indueix una activació prematura de les caspases. No obstant, els nostres resultats estableixen que l'activació prematura de caspases tan sols es detecta en agents intercalants pertanyents a la família de les benzofenandridines, tals com queleritrina i sanguinarina. De manera que, sembla que aquest esdeveniment bioquímic no es pot associar de forma directa ni a propietats intercalants, ni d'unió als solcs de l'ADN. Tot i així, aquestes dades són sumament rellevants, ja que suggereixen diverses hipòtesis sobre les causes desencadenants d'una activació prematura de les caspases. En primer lloc, podria ser que aquest esdeveniment bioquímic fos exclusiu de compostos de la família de les benzofenandridines amb propietats intercalants a l'ADN i capaços de generar estrès oxidatiu. En aquest cas, caldria analitzar en altres compostos pertanyents a aquesta família i amb aquestes mateixes propietats, la producció de ROS i l'activació de caspases. Si aquests dos paràmetres es detectessin de forma prematura en aquests compostos, estariem recolzant aquesta primera hipòtesi. Cal remarcar que, en el cas de sanguinarina, des de la literatura s'ha descrit que aquesta és capaç de desencadenar una activació anticipada de caspases concomitant a una producció de ROS (Debiton, Madelmont et al. 2003), pel que aquesta dada afavoreix encara més aquest primer supòsit. No obstant, en cas de considerar aquesta primera hipòtesi, caldria descartar l'exclusivitat d'aquests compostos realitzant un anàlisi de la producció de ROS i activació de caspases, però en cèl·lules co-tractades amb un estímul inductor d'estrès oxidatiu i els mateixos agents d'unió a l'ADN emprats fins ara. L'absència d'una activació de caspases anticipada en presència d'una detecció de ROS en aquests co-tractaments recolzaria aquesta primera hipòtesi. Per contra, la detecció d'aquests dos esdeveniments ens plantejarien un segon supòsit. És a dir, aquestes dades ens permetrien considerar que el desencadenament de l'activació prematura de les caspases requereix d'una producció anticipada de ROS i d'un tractament amb un compost que presenti propietats d'unió a l'ADN. Igualment, tenint en compte aquesta segona hipòtesi, caldria

tenir present una tercera possibilitat. Podria ser que només es requerís una producció prematura de ROS per la inducció d'una activació anticipada de les caspases. En aquest sentit, malgrat actualment no se sàpiga com, resultaria interessant inhibir les propietats intercalants de l'ADN en agents citotòxics que presentessin tant aquestes propietats, com la capacitat de desencadenar una resposta d'estrès oxidatiu. En aquest supòsit, la detecció d'una activació anticipada de les caspases ens estaria suggerint que les propietats intercalants a l'ADN de queleritrina no són necessàries per la inducció d'una activació prematura de caspases.

Per altra banda, resulta interessant analitzar la rellevància del fet que el procés de mort induït per queleritrina estigui manifestant un fenotip nuclear no apoptòtic depenent de l'activació prematura de caspases. Aquesta qüestió ens porta a plantejar fins a quin punt podem considerar la mort induïda per queleritrina com a una mort apoptòtica defectiva en la manifestació dels *hallmarks* apoptòtics, o bé, una variant de mort necròtica depenent de caspases. Per una banda, els anàlisis morfològics obtinguts per microscopia electrònica rebelen un fenotip nuclear que recorda al d'una cèl·lula necròtica. D'altra banda, si assumim que es tracta d'un fenotip necròtic, estariem definint el procés de mort induït per queleritrina com a una "necrosi depenent de caspases". Per això, d'entrada discutirem la consideració del fenotip nuclear provocat per queleritrina com a necròtic.

En primer lloc, hem de tenir en compte que l'aspecte morfològic nuclear que detectem en les cèl·lules tractades amb queleritrina, coincideix amb la descripció morfològica que Vandenameele i col·laboradors fan de les cèl·lules necròtiques (Vandenameele, Galluzzi et al. 2010). En aquest sentit, cal recordar que les imatges de microscopia electrònica del fenotip de mort induït per queleritrina il·lustren un nucli amb una envolta nuclear dilatada i la presència de diverses masses irregulars de cromatina. Per altra banda, és de destacar que varis treballs descriuen la inducció de morts necròtiques a través d'imatges de microscopia electrònica que il·lustren un aspecte dels nuclis semblant al de queleritrina (Radakovic-Fijan, Rappersberger et al. 1999; Pham, Bubici et al. 2007; Yasuhara, Zhu et al. 2003; Martin, Al-Abdulla et al. 1998). De forma més concreta, cal remarcar un treball en el que mostren, per un anàlisi de microscopia electrònica, l'aspecte morfològic de cèl·lules derivades de leucèmia limfocítica crònica tractades amb queleritrina (Vogler, Weber et al. 2009). Tot i que els autors no mostren l'aspecte nuclear de les cèl·lules tractades a una hora, malgrat hagin detectat una sortida de citocrom c al citosol i una activació de caspasa-3 a 30 minuts i una hora de tractament respectivament, després de quatre hores de tractament les cèl·lules manifesten els mateixos canvis nuclears que nosaltres detectem amb queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y. Tot i així, aquest treball fa referència als canvis nuclears induïts per l'alcaloide com a una "condensació parcial de la cromatina" sense arribar a especificar la modalitat del procés de mort. No es parla directament d'un fenotip nuclear necròtic, sinó més aviat de canvis morfològics apoptòtics. No obstant, els treballs citats anteriorment amb fenotips nuclears similars al nostre, esmenten clarament la definició d'una mort necròtica. Caldria analitzar altres paràmetres relacionats amb el concepte d'una mort necròtica com ara la baixada d'ATP, la qual és més dràstica en aquest tipus de mort, o bé, la secreció al medi extracel·lular d'algun factor característic d'una resposta necròtica com el mediador inflamatori HMG-B1 (*high mobility group box 1*) (Eguchi, Shimizu et al. 1997; Rovere-Querini, Capobianco et al. 2004). Tot i així cal dir, que es van arribar a mesurar els nivells d'ATP en el tractament de queleritrina (dada no mostrada), i que aquests disminueixen de forma dràstica en comparació als d'estaurosporina. Pel que fa a HMG-B1, Wan i col·laboradors analitzen la presència d'aquest factor al medi extracel·lular tant de les cèl·lules MEF wt com de les DKO de Bax i Bak tractades amb queleritrina (Wan, Chan et al. 2008). Els autors no arriben a detectar HMG-B1 en el medi extracel·lular d'aquestes cèl·lules i

amb aquesta dada ja descarten que el procés de mort sigui necròtic. No obstant, cal remarcar que la producció de ROS, juntament amb la depleció d'ATP, és un dels processos cel·lulars actius més característics de la mort necròtica (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). En resum, el conjunt de dades apunta a considerar tant el fenotip nuclear induït per queleritrina com el procés de mort d'aquesta com a necròtic. Tot i així, resultaria interessant analitzar tots aquests paràmetres que estan relacionats amb la mort necròtica en el procés de mort induït per queleritrina però de forma comparativa a estímuls de mort purament necròtics.

Pel que fa a la consideració de definir una mort necròtica dependent de caspases, cal remarcar que l'última classificació dels processos de mort cel·lular no engloba aquesta modalitat de mort. Malgrat es reconegui la necrosi regulada com a una modalitat de mort necròtica dependent de certes molècules de senyalització, aquesta mort en aquesta classificació es considera igualment independent de caspases. No obstant, existeixen treballs que parlen clarament sobre una necrosi dependent de caspases (Niquet, Seo et al. 2006; Meurette, Rebillard et al. 2007), fet que recolza la nostra hipòtesi de poder definir el procés de mort induït per queleritrina sota aquests termes. A més, cal esmentar que en aquests treballs, les cèl·lules que manifesten aquest tipus de mort mostren per imatges de microscopia electrònica un aspecte del nucli necròtic semblant a l'induït per queleritrina. De totes maneres, si assumim que el procés de mort desencadenat per queleritrina es pot definir com a una necrosi dependent de caspases, no hauríem de descartar la possible implicació de les molècules de senyalització més associades a la necrosi regulada, tals com les quinases RIP-1 i RIP-3. De fet, un d'aquests treballs que descriuen una necrosi dependent de caspases esmenta que les cèl·lules que manifesten aquesta modalitat de mort requereixen l'activitat de RIP-1 i que a, més a més, aquestes tan sols induïxen la mort necròtica quan el pH del medi cel·lular és àcid, donat que quan aquest és fisiològic la mort passa a ser de tipus apoptòtica (Meurette, Rebillard et al. 2007). En aquest aspecte, val la pena realitzar un apunt. Aquesta darrera dada, ens fa plantejar que resultaria interessant analitzar el pH del medi durant el tractament amb queleritrina i amb la concentració de DTT al medi de cultiu que permet la manifestació de la morfologia apoptòtica. La detecció d'un pH àcid tan sols quan s'està induïnt el fenotip no apoptòtic ens faria pensar sobre un efecte directe de ROS en la baixada del pH durant la mort induïda per queleritrina (la relació entre el fenotip no apoptòtic i el paràmetre del pH s'analitza més endavant en l'apartat 3). Tot i així i seguint amb aquest anàlisi, cal dir que a nivell d'activació caspases, podríem arribar a relacionar aquesta amb una baixada del pH, ja que alguns autors estableixen aquesta relació en situacions d'un estrès acídica (Park, Lyons et al. 1999). A més, en el nostre cas en particular, estaríem associant aquesta baixada del pH amb una activació prematura de les caspases, suposant que també detectéssim un increment del pH en les condicions de DTT en les quals s'està endarrerint l'activació de caspases desencadenada per queleritrina. Pel que fa a la implicació de les proteïnes RIP-1 i RIP-3 en el procés de mort induït per queleritrina, part de les nostres dades apunten a una possible participació d'aquestes proteïnes. Els nostres resultats mostren que l'inhibidor de necroptosi necrostatina-1 impedeix tant la mort cel·lular com l'activació de caspases induïdes per queleritrina, pel que en aquest aspecte estaríem contribuint a considerar aquesta mort com a una necrosi dependent de caspases. No obstant, l'efecte específic d'inhibició de la necrostatina-1 en RIP-1 es posa en dubte des de la literatura. Alguns autors descriuen la inhibició de processos de mort necròtics de forma independent a RIP-1 mitjançant l'ús de necrostatina-1 (Cho, McQuade et al. 2011). Inclús, recentment s'ha descrit una proteïna inflammatòria anomenada IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) com a una altra diana de necrostatina-1 (Vandenabeele, Grootjans et al. 2012). De fet, molts estudis comproven l'efecte específic d'inhibició de necrostatina-1 mitjançant el silenciament gènic de RIP-1 o bé, induïnt la degradació d'aquest amb geldanamicina, com a inhibidor de la xaperona de quinases Hsp90 (*heat shock protein 90*) (Meurette, Rebillard et al.

2007; Cho, McQuade et al. 2011). És a dir, tot plegat ens suggereix que caldria primerament comprovar l'efecte específic d'inhibició d'aquest compost abans de procedir a estudiar la implicació de RIP-1 en el procés de mort desencadenat per queleritrina, ja fos mitjançant una disminució de l'expressió de RIP-1 o induint a la seva degradació. En aquest cas, caldria hipotetitzar sobre tres possibles resultats. En primer lloc, si suposem que l'efecte de necrostatina és específic de RIP-1, veuríem protecció de la mort induïda per queleritrina en les cèl·lules on s'han compromès els nivells de la quinasa. Caldria, llavors, analitzar la mort induïda per queleritrina silenciament els nivells d'expressió de RIP-3, donat que la mort necroptòtica dependent de RIP-1 implicaria també una dependència de RIP-3 (Cho, Challa et al. 2009; Galluzzi, Vitale et al. 2012). En aquest punt val la pena tenir present, que tot i que no s'observés cap efecte de protecció de la mort desencadenada per l'alcaloide en cèl·lules amb els nivells de RIP-3 compromesos, estariem davant una mort necroptòtica solament dependent de RIP-1. En el segon supòsit, podríem esperar que les cèl·lules amb l'expressió de RIP-1 silenciada, s'estiguessin morint de la mateixa manera que les wt, després de ser tractades amb queleritrina. Estariem, doncs, descartant un efecte específic d'inhibició de necrostatina-1 sobre RIP-1. De totes maneres, en aquest punt caldria analitzar la mort de l'alcaloide en cèl·lules amb els nivells de RIP-3 compromesos, ja que podria tractar-se d'una modalitat de mort necroptòtica dependent només de RIP-3. Finalment, el tercer supòsit seria que les cèl·lules amb els nivells d'expressió de RIP-1 silenciats estiguessin morint amb un fenotip diferent al de queleritrina, després de tractar-se amb aquesta. És més, en el cas que inclús, s'arribés a detectar un fenotip nuclear apoptòtic, podríem arribar a suggerir sobre la implicació de RIP-1 en la manifestació d'una mort necroptòtica dependent de caspases mitjançant la producció de ROS. És a dir, en aquest cas, RIP-1 estaria actuant com un interruptor molecular favorable a la inducció d'aquesta modalitat de mort, ja que en la seva absència s'estaria desencadenant una mort apoptòtica. En qualsevol cas, el conjunt de les dades apunta a considerar que podem estar davant d'una necroptosi dependent de caspases.

### 3. Implicació del sistema ICAD·CAD en el fenotip de mort induït per queleritrina

Els nostres resultats mostren que les cèl·lules SH-SY5Y són incapaces de manifestar tant una morfologia apoptòtica com una fragmentació oligonucleosomal de l'ADN (LMW, *low molecular weight*), després de ser tractades amb queleritrina. L'absència d'aquests dos *hallmarks* apoptòtics es produeix, fins i tot, quan la mort desencadenada per aquest alcaloide és més potent que la induïda per estaurosporina. Varis estudis demostren que CAD és el responsable directe tant de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN com de la morfologia apoptòtica, en cèl·lules sotmeses a un tractament amb un inductor apoptòtic (Enari, Sakahira et al. 1998; Halenbeck, MacDonald et al. 1998; Liu, Zou et al. 1997; Liu, Li et al. 1998). De fet, els timòcits derivats de ratolins KO (*knockout*) per CAD o per ICAD, són resistents a la fragmentació de l'ADN i a la condensació de la cromatina (Kawane, Fukuyama et al. 2003; Zhang, Liu et al. 1998). Donada aquesta rellevància del sistema ICAD·CAD en la inducció del fenotip de mort apoptòtic, a continuació s'analitzarà la implicació d'aquest sistema en el procés de mort induït per queleritrina. D'aquesta manera, es pretén discutir i cercar les causes relacionades amb aquest sistema que poden justificar l'absència del fenotip apoptòtic manifestada en les cèl·lules SH-SY5Y, després de tractar-se amb l'alcaloide.

D'entrada, és interessant remarcar que queleritrina, malgrat no sigui capaç d'induir ni la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN ni la morfologia apoptòtica, sí que és capaç de desencadenar la hidròlisi de l'ADN en fragments d'alt pes molecular (HMW, *high molecular weight*). A més, cal destacar que la majoria de models cel·lulars de mort apoptòtica que manifesten

aquesta degradació de l'ADN sense presència de LMW, normalment mostren una morfologia nuclear apoptòtica tipus I. Així per exemple, les cèl·lules IMR-5 en resposta a un insult apoptòtic tan sols manifesten la fragmentació HMW de l'ADN i de forma concomitant a l'adquisició de la morfologia tipus I (Yuste, Bayascas et al. 2001; Iglesias-Guimaraes, Gil-Guinon et al. 2012). En canvi, en el procés de mort induït per queleritrina veiem que la degradació HMW coincideix amb un fenotip nuclear no apoptòtic. És més, aquesta fragmentació de l'ADN es produeix de forma depenent de caspases. Tot i així, varis treballs suggereixen que aquesta degradació de l'ADN és independent del sistema ICAD·CAD. Per una banda, s'ha vist que les cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores d'ICAD amb el residu Asp117 mutat (D117E) manifesten la fragmentació HMW en resposta a un insult apoptòtic (Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005). D'altra banda, un altre treball analitza que les cèl·lules SK-N-AS amb els nivells compmesos de CAD o ICAD desencadenen la fragmentació HMW després de tractar-se amb un estímul apoptòtic (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guinon et al. 2013).

En qualsevol cas, per tal de discutir si s'està produint algun defecte en l'activació del sistema ICAD·CAD que pogués ser responsable de l'absència dels *hallmarks* apoptòtics, analitzarem d'entrada la implicació d'ICAD. L'absència del fenotip apoptòtic en les cèl·lules tractades amb queleritrina es podria deure a una manca del processament de l'inhibidor de CAD que, en conseqüència, no permetés l'alliberament de l'endonucleasa. De fet, alguns autors arriben a relacionar l'absència de la degradació de l'ADN amb una inhibició del processament d'ICAD (Zhao, Lu et al. 2001). En el nostre cas, els nostres resultats mostren una proteòlisi d'ICAD de forma totalment sincrònica a l'activació de caspasa-3 i, a més a més, el fragment C-terminal p11 es detecta de forma més intensa en les cèl·lules tractades amb queleritrina que en les exposades a a estaurosporina. Aquesta dada és quelcom rellevant si es té en compte que la generació d'aquest fragment s'ha proposat com a un factor determinant per considerar que l'endonucleasa s'està alliberant de forma correcta de la seva xaperona ICAD-L (isoforma llarga d'ICAD) (Tang and Kidd 1998). Tot plegat, fa considerar que no podem associar el defecte de la manifestació dels *hallmarks* apoptòtics amb una inhibició del processament d'ICAD. No obstant, ens podríem plantejar algun defecte en l'alliberament de CAD derivada de la prematura proteòlisi d'ICAD, malgrat la detecció del fragment C-terminal p11. En aquest sentit, podria ser que es requeressin de forma específica en el procés de mort desencadenat per queleritrina, la presència d'una major quantitat d'ICAD per tal d'afavorir l'alliberament de l'endonucleasa. De fet, un treball de Takahashi i col·laboradors, relaciona la sobreexpressió d'ICAD amb la manifestació de la morfologia apoptòtica tipus II, tot i que en aquest cas, el defecte apoptòtic es deu directament a la deleció del gen d'ICAD en la línia cel·lular que analitzen (Takahashi, Ozaki et al. 2007). No obstant, en el procés de mort induït per queleritrina la sobreexpressió d'ICAD-L no permet recuperar la morfologia apoptòtica. Per tant, el requisit d'expressar majors nivells d'aquesta no sembla ser la raó que explicaria el defecte de la manifestació del fenotip nuclear apoptòtic. Per altra banda, resulta interessant analitzar com s'està produint el processament d'ICAD al llarg del tractament de queleritrina. Malgrat detectem el fragment C-terminal p11 en els diferents punts temporals del tractament, val la pena destacar que els fragments C-terminal p24 i p18 provinents de la proteòlisi en el residu Asp117 d'ICAD-L i ICAD-S (isoforma d'ICAD curta) respectivament, són absents en els darrers temps de tractament (4h i 6h) amb l'acaloide. Aquesta dada és quelcom rellevant, si considerem que les cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores de la forma mutant d'ICAD D117E no poden generar el fragment p24 ni manifestar els *hallmarks* apoptòtics, després de ser tractades amb estaurosporina (Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005). Per contra, les cèl·lules SH-SY5Y sobreexpressores d'ICAD amb el residu Asp224 mutat (D224E) generen en excés el fragment p24 i mostren els *hallmarks* apoptòtics, en resposta a l'estímul d'estaurosporina (Yuste, Sanchez-Lopez et al. 2005). És a dir, el conjunt



d'aquestes dades apunta a considerar que potser l'absència de part d'aquests fragments, està relacionada amb la manca del fenotip apoptòtic en les cèl·lules SH-SY5Y tractades amb queleritrina. No obstant, aquesta hipòtesi només explicaria la manca dels *hallmarks* apoptòtics en els darrers temps de tractament (4h i 6h) amb l'alcaloide, donat que en els temps anteriors es detecten tots els fragments derivats de la proteòlisi d'ICAD i aquest fet, coincideix amb la manifestació del fenotip nuclear no apoptòtic de queleritrina. Tot plegat, fa que descartem aquesta darrera qüestió com a una possible causa de l'absència del fenotip apoptòtic en el procés de mort induït per queleritrina.

Una altra raó per la qual es podria pensar que els *hallmarks* apoptòtics no es manifesten en el procés de mort cel·lular desencadenat per queleritrina, és que les cèl·lules SH-SY5Y requereixin expressar uns nivells majors de CAD per tal de poder manifestar el fenotip apoptòtic. En aquest sentit, cal destacar per exemple, el treball de Mukae i col·laboradors que correlaciona en diferents línies cel·lulars tumorals humanes els nivells d'expressió de CAD amb la degradació LMW (Mukae, Enari et al. 1998). Els autors associen una menor expressió de l'endonucleasa amb una absència de la degradació oligonucleosomal de l'ADN i detecten que aquesta es recupera quan sobreexpressen CAD. En aquest cas, però, la recuperació de la degradació LMW es relaciona directament per una absència de nivells d'expressió de CAD. No és el cas, per exemple, de les cèl·lules IMR-5, les quals no manifesten els *hallmarks* apoptòtics donat que CAD acaba desapareixent de la fracció soluble durant el tractament amb estaurosporina (Yuste, Bayascas et al. 2001). La recuperació del fenotip apoptòtic en aquestes cèl·lules es realitza també mitjançant la sobreexpressió de CAD, encara que la causa del defecte en la inducció dels *hallmarks* apoptòtics no es basa en un problema directe d'absència de nivells de l'endonucleasa. En el nostre cas, no aconseguim restablir el fenotip apoptòtic ni de les cèl·lules SH-SY5Y ni de les IMR-5 mitjançant la sobreexpressió dels nivells de CAD, després de tractar les cèl·lules amb queleritrina. Definitivament, el defecte apoptòtic del procés de mort induït per l'alcaloide no es centra en una qüestió de nivells de CAD. Per aquesta raó, a continuació ens centrarem en analitzar les causes que poden portar a que CAD no pugui induir ni la morfologia apoptòtica ni la degradació oligonucleosomal de l'ADN en les cèl·lules tractades amb queleritrina.

D'entrada, cal remarcar que CAD no pateix cap procés de degradació, donat que mostrem que els seus nivells es mantenen constants durant el transcurs del tractament amb l'alcaloide en extractes totals de proteïna. Una altra qüestió que podria estar relacionada amb el defecte apoptòtic del procés de mort induït per queleritrina i associat a CAD seria que aquesta no s'estigués localitzant a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb l'alcaloide. Per tal de discutir i comprendre aquest punt, cal remarcar un treball fet al nostre laboratori que mostra com en un subfraccionament cel·lular, en el què s'aconsegueix aïllar la fracció cromatínica de la nucleoplasmàtica, els nivells de CAD localitzats a la fracció cromatínica provenen de la fracció citoplasmàtica en resposta a un estímul apoptòtic (Iglesias-Guimaraes, Gil-Guion et al. 2012). En concret, l'estudi mostra una baixada dels nivells de CAD a la fracció citoplasmàtica, correlacionada amb un increment de la presència de l'endonucleasa a la fracció cromatínica. Aquesta correlació es dona amb la detecció d'uns nivells de CAD a la fracció nucleoplasmàtica constants. L'anàlisi s'estableix en les cèl·lules SH-SY5Y i de forma depenent a un gradient de concentracions creixents d'estaurosporina. A més, es determina que es requereixen certs nivells de CAD a la fracció cromatínica per promoure la degradació oligonucleosomal de l'ADN durant un procés de mort apoptòtica. Pel que fa als nostres resultats, cal recordar que detectem CAD a la fracció cromatínica després del tractament amb queleritrina i amb uns nivells majors que els mostrats pel tractament amb estaurosporina. En canvi, la fracció nucleoplasmàtica pràcticament no mostra diferències

substancials entre els nivells de CAD detectats durant el tractament de queleritrina. En el nostre cas, és difícil que apreciïem una translocació de CAD desde la fracció citoplasmàtica a la cromatínica, ja que tan sols intuïm una baixada de l'endonucleasa en la fracció citoplasmàtica al darrer temps de tractament de queleritrina. No obstant i de forma comparativa amb estaurosporina, el més rellevant és que CAD es localitza en nivells suficients a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina, com per promoure la degradació oligonucleosomal de l'ADN. Si l'estudi es segueix comparant amb els resultats obtinguts per estaurosporina, el conjunt de les dades ens suggereixen que la manca de la degradació LMW al procés de mort induït per queleritrina podria ser deguda a una localització anticipada de CAD a la fracció cromatínica. En aquest sentit, es podria arribar a pensar que aquesta mort tan ràpida no permet la correcta activació de factors que poden promoure l'activitat de CAD i que, a la vegada, podrien ser determinants per la manifestació del fenotip apoptòtic en el procés de mort induït per queleritrina. De la mateixa manera, en el sentit oposat, també es podria suggerir que aquest tipus de mort no permet la inactivació de molècules inhibidores de l'activitat de CAD que estarien afavorint la inducció d'un fenotip de mort no apoptòtic. És per això, que a continuació es discutirà sobre les possibles molècules que es podrien requerir tant per promoure, com per inhibir l'activitat de l'endonucleasa.

Per una banda, podríem suggerir diverses proteïnes associades a la cromatina, tals com els factors nuclears HMG-1 i -2 (*high mobility group*), la histona H1 i la topoisomerasa II, les quals poden estimular de forma considerable l'activitat de CAD (Liu, Li et al. 1998; Toh, Wang et al. 1998; Widlak, Li et al. 2000). Tot i així, els autors d'aquests treballs no estableixen que aquests factors siguin imprescindibles per l'activació de CAD. De totes maneres, podria ser que en el procés de mort induït per queleritrina fos determinant incrementar els nivells basals d'una o diverses d'aquestes proteïnes per tal d'aconseguir detectar el fenotip apoptòtic. D'altra banda, un estudi de Liu i col·laboradors estableix que la sobreexpressió de la xaperona Hsp70 (*heat shock protein 70*) en cèl·lules Jurkat és capaç d'incrementar significativament la fragmentació de l'ADN en resposta a un a estímul apoptòtic (Liu, Kishi et al. 2003). En concret, determinen que Hsp70 no solament incrementa l'activitat de CAD, sinó que promou la seva estabilització com a resultat d'interaccionar amb molècules de l'endonucleasa lliures. A més a més, els autors també detecten aquesta interacció sense sobreexpressar la xaperona en un model cel·lular capaç de fragmentar el ADN en resposta a un estímul apoptòtic. En aquest sentit, podríem suggerir que en el procés de mort desencadenat per queleritrina, aquesta interacció no s'estigués executant, ja fos perquè la xaperona està degradada o inhibida, o perquè CAD està interaccionant amb algun altre factor que desconeixem i que impediria aquesta interacció. Una altra possibilitat, seria que aquesta interacció s'estigués realitzant, però que el procés de mort desencadenat per queleritrina requereís expressar uns nivells majors de Hsp70 per tal de fer front a un alliberament molt ràpid i massiu de CAD. Un altre estudi, associa la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) amb la inducció de la degradació LMW (Lu, Zhu et al. 2006). Lu i col·laboradors determinen que cèl·lules MEF transfectades amb H2AX degraden l'ADN de forma oligonucleosomal, requerint tant de l'activació de caspasa-3 com de la fosforilació d'H2AX, després de ser tractades amb radiació ultravioleta. En canvi, en el mateix estudi, cèl·lules MEF KO per H2AX són incapaces de manifestar la fragmentació LMW després de ser sotmeses al mateix tractament. A més, els autors arriben a detectar *in vitro* la interacció de H2AX amb CAD. Un altre treball, mostra la fosforilació de la histona H2B com a un factor determinant en la condensació apoptòtica de la cromatina (Cheung, Ajiro et al. 2003). En cèl·lules de pollastre DT40 KO per CAD, els autors correlacionen un increment de la fosforilació de la histona H2B amb un augment de la condensació apoptòtica de la cromatina respecte a les cèl·lules DT40 wt, després de ser tractades amb un estímul apoptòtic. En aquest aspecte cal dir que resultats obtinguts en el procés de mort desencadenat per queleritrina, les

cèl·lules presenten uns nivells de fosforilació tant de H2AX com H2B similars als manifestats en el tractament amb estaurosporina (dada no mostrada). Això suggereix que, en el nostre cas, la manca en aquestes fosforilacions possiblement no siguin la causa del fenotip nuclear alterat observat. Tot i així, podríem arribar a pensar que, en el cas de H2AX, no s'estigués realitzant la interacció descrita entre aquesta i CAD, fet que explicaria l'absència del fenotip apoptòtic en el procés de mort induït per queleritrina.

Pel que fa a molècules que inhibeixin l'activitat de CAD, cal destacar CIIA (*CAD inhibitor that interacts with ASK*), la qual inhibeix l'endonucleasa per interacció amb el domini CIDE i sense afectar al processament d'ICAD executat per caspasa-3 (Cho, Kim et al. 2003). Cal remarcar, que aquesta proteïna també és capaç d'inhibir la proteïna quinasa ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), la qual activa les vies de senyalització JNK/SAPK i p38, i participa en processos de mort apoptòtica desencadenada per TNF- $\alpha$ , Fas, estrès reticular i ROS (Ichijo, Nishida et al. 1997). En el cas d'ASK1, CIIA inhibeix la seva activació per interacció a nivell de la part C-terminal de la quinasa. Tenint en compte això, CIIA podria estar inhibint a la vegada les dues proteïnes. Resultaria interessant, analitzar els nivells d'expressió d'aquest inhibidor en el procés de mort induït per queleritrina i comparar-los amb els obtinguts en el tractament d'estaurosporina. Uns nivells majors d'expressió de CIIA en el tractament de queleritrina, podrien correlacionar-se amb l'absència del fenotip apoptòtic, i més quan aquest inhibidor de CAD està actuant sense afectar al processament d'ICAD. No obstant, CIIA s'ha reportat en ratolí i el seu homòleg en humans (hVPS28) no s'ha associat a cap funció similar (Bishop and Woodman 2001), fet que dificulta poder considerar aquest inhibidor com a una molècula rellevant en el procés de mort desencadenat per queleritrina. Una altra proteïna que podríem tenir present com a inhibidora de CAD és B23, o altrament coneguda com a nucleofosmina, la qual actua com a receptor nuclear del fosfolípid PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) (Ahn, Liu et al. 2005; Ye 2006). En concret, aquesta proteïna és capaç d'interaccionar amb CAD provocant un efecte d'inhibició en la degradació de l'ADN, després que el complex B23-PIP3 s'hagi constituït. A més a més, s'ha demostrat que B23 pot interaccionar amb l'ATP donant lloc a un complex que promou la seva translocació al nucleoplasma (Wu, Lam et al. 1995). El lloc d'unió de B23 amb PIP3 és el mateix que el lloc d'unió amb l'ATP. No obstant, l'ATP és el que actua com a substrate preferencial per B23 sent capaç, així, de desplaçar PIP3 de B23 (Choi, Lee et al. 2008). Per tant, aquest fet suggereix que la formació del complex B23-PIP3 possiblement es doni quan els nivells d'ATP siguin baixos i, en conseqüència, s'afavorirà a la inhibició de CAD per part d'aquest complex. En aquest sentit, es podria pensar que durant un procés de mort cel·lular on els nivells d'ATP hagin baixat dràsticament, es pot estar afavorint la generació del complex B23-PIP3 i la conseqüent inhibició de CAD. Tal i com s'ha esmentat en un punt anterior de la discussió, resultats obtinguts al laboratori mostren que en el procés de mort induït per la queleritrina, els nivells d'ATP baixen de forma considerable respecte al de les cèl·lules tractades amb estaurosporina (dada no mostrada). Malgrat que aquest fet estigués afavorint la unió de B23 amb molècules PIP3 i, en conseqüència, la possible inhibició de CAD, caldria concloure aquesta hipòtesi disminuint els nivells d'expressió de B23. Una altra possible molècula que podríem arribar a considerar que estigués inhibint CAD és la proteïna Ebp1. En un treball fet en cèl·lules PC12 tractades amb el factor de creixement neuronal (NGF), s'ha vist que Ebp1 contribueix a l'absència de la degradació oligonucleosomal de l'ADN a través de la interacció amb CAD i suprimint el processament d'ICAD (Ahn, Liu et al. 2006). Respecte al procés de mort desencadenat per queleritrina, resulta difícil considerar una implicació rellevant del factor Ebp1 en la inhibició de la degradació apoptòtica de l'ADN, donat que, tal i com hem comentat anteriorment, detectem ICAD processada en les cèl·lules SH-SY5Y tractades amb queleritrina.

Tot i la possibilitat de la presència d'alguna proteïna, com B23, que estigués inhibint l'activitat de CAD, una altra explicació per la manca del fenotip apoptòtic seria que el propi compost estigués realitzant un efecte d'inhibició directe sobre l'endonucleasa. En aquest sentit, resulta important remarcar un treball de Sikora i col·laboradors en el que descriuen la curcumina com a un inhibidor directe de l'activitat de CAD (Sikora, Bielak-Zmijewska et al. 2006). Els autors observen que aquest compost és capaç d'inhibir tant la morfologia apoptòtica com la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN, en cèl·lules Jurkat en resposta a un estímul apoptòtic. La inhibició del fenotip apoptòtic realitzada per curcumina succeeix malgrat s'arribi a detectar l'activació de caspasa-3 i la baixada de les pro-formes d'ICAD, després del tractament conjunt amb curcumina i l'estímul apoptòtic. A més, els nivells de CAD en extractes totals de proteïna no s'alteren en presència de curcumina. Inclús, els autors detecten que curcumina és capaç d'inhibir la degradació oligonucleosomal de l'ADN promoguda *in vitro* per la proteïna recombinant de CAD. La inhibició de la fragmentació apoptòtica de l'ADN es realitza malgrat curcumina no impedeixi la unió de CAD a l'ADN i el treball suggereix que, possiblement, aquest compost estigui inhibint l'endonucleasa per unió al seu centre actiu. La similitud d'aquestes dades amb els resultats obtinguts en el procés de mort desencadenat per queleritrina recolza encara més la hipòtesi de considerar aquesta com a un possible inhibidor de CAD. Aquesta hipòtesi guanya encara més pes si tenim en compte que mostrem que queleritrina és capaç d'evitar tant la inducció de la morfologia apoptòtica com la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN induïts per estaurosporina. A més a més, veiem que la inhibició del fenotip apoptòtic d'estaurosporina es realitza malgrat ICAD es processa per caspasa-3 i CAD es localitzi a la fracció cromatínica durant el co-tractament d'estaurosporina i queleritrina. De forma similar, demostrem que la curcumina també impedeix el fenotip apoptòtic d'estaurosporina, sense afectar ni l'activació de caspasa-3 ni el processament d'ICAD induïts en el co-tractament d'estaurosporina i curcumina. No obstant, el nostre anàlisi dels nivells totals de l'endonucleasa mostra clarament una baixada considerable de CAD, tant en el tractament de curcumina com en el co-tractament de curcumina i estaurosporina. Sembla doncs, que la curcumina pot estar induint algun procés de degradació de CAD, malgrat el treball de Sikora i col·laboradors no hagi detectat un efecte similar. Aquest fet probablement explicaria la poca quantitat de CAD detectada en la fracció cromatínica de les cèl·lules co-tractades amb estaurosporina i curcumina i, per tant, la inhibició del fenotip apoptòtic d'estaurosporina realitzada per curcumina. No obstant, en el co-tractament amb queleritrina i estaurosporina, la quantitat de CAD present a la fracció cromatínica és major que la mostrada per la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb estaurosporina. Això suggereix, de nou, que la inhibició realitzada per queleritrina en la inducció del fenotip apoptòtic d'estaurosporina no és deguda a una manca dels nivells de CAD a la fracció cromatínica. En qualsevol cas, les dades que mostrem no ens permeten valorar si queleritrina està evitant el fenotip apoptòtic d'estaurosporina mitjançant una inhibició directa de CAD, o bé, una inhibició de l'endonucleasa a nivell de mecanismes de senyalització.

Una altra possible causa que podríem suggerir per explicar la manca del fenotip apoptòtic induït per queleritrina seria l'efecte intercalant sobre l'ADN que exerceix aquest compost, ja que podríem plantejar-nos que aquesta interacció estigués desfavorint l'actuació de l'endonucleasa. Els nostres resultats mostren que tots els agents d'unió a l'ADN emprats eviten tant la inducció de la morfologia apoptòtica com la degradació oligonucleosomal de l'ADN induïda per estaurosporina. Per l'anàlisi d'aquests resultats, cal recordar els diferents tipus d'interacció amb l'ADN dels agents utilitzats: intercalant amb preferència d'unió a seqüències de l'ADN riques en GC contigües i alternades pel cas de queleritrina i sanguinarina respectivament (Bajaj, McLean et al. 1990; Bai, Zhao et al. 2006); unió al solc menor de l'ADN amb preferència a les seqüències riques en AT en el cas del compost bisbenzimidaz de Hoechst 33258 (Fox and Waring 1984); i

finalment, unió al solc menor de l'ADN i intercalant en el cas del bromur d'etidi (Jain, Tsai et al. 1977). Tenint en compte aquestes dades i els resultats obtinguts, estem establint que la inhibició del fenotip apoptòtic no és dependent del tipus d'interacció a l'ADN, ja que els *hallmarks* apoptòtics es poden inhibir per agents intercalants i/o d'unió al solc menor de l'ADN. Aquesta dada és sumament rellevant donat que estem generalitzant l'efecte d'inhibició del fenotip apoptòtic detectat amb queleritrina cap a altres compostos, també capaços d'interaccionar amb l'ADN. La importància d'aquests resultats deriva del fet que una gran quantitat dels agents quimioteràpics actuals presenten propietats d'unió a l'ADN, pel que s'hauria de considerar la possible inhibició del fenotip apoptòtic d'aquests compostos i, en conseqüència, com l'alteració del fenotip de mort pot estar influent en el microambient tumoral tractat (aquest punt s'analitza més àmpliament en l'apartat 5 de la discussió). A més, cal afegir que la rellevància d'aquestes dades també deriva del fet de considerar que compostos quimioteràpics amb propietats d'unió a l'ADN administrats en tractaments sinèrgics podrien estar alterant el fenotip de mort dels altres agents farmacològics. Per altra banda, resulta interessant analitzar el conjunt dels nostres resultats amb els obtinguts en un treball que estudia la inducció dels *hallmarks* apoptòtics en el context d'agents d'unió a l'ADN. Es tracta d'un estudi de tipus *cell free system* en el qual es tracten nuclis intactes de cèl·lules Hela amb una nucleasa exògena (MNasa) per tal d'induir els *hallmarks* apoptòtics (Widlak, Palyvoda et al. 2002). El treball analitza l'efecte de la condensació de la cromatina i de la degradació oligonucleosomal de l'ADN induïts en aquest sistema, en presència de diferents tipus d'agents d'unió a l'ADN. En concret, s'empren: el bromur d'etidi i la bisbenzimidida de Hoechst 33258; la distamicina A, la qual s'uneix al solc menor de l'ADN amb preferència en seqüències riques en AT (Van Dyke, Hertzberg et al. 1982; Fox and Waring 1984); la cromomicina A3, que s'uneix preferentment al solc menor de l'ADN però en seqüències riques en GC (Van Dyke and Dervan 1983; Gao and Patel 1989); i el verd de metil, el qual s'uneix al solc major de l'ADN (Kim and Norden 1993). Els autors d'aquest treball, detecten que tots aquests agents excepte el bromur d'etidi, no inhibeixen la degradació LMW de l'ADN. Per contra, observen que tots els agents d'unió a l'ADN emprats bloquegen la condensació de la cromatina, excepte el compost verd de metil. En resum, amb aquestes dades podem suggerir que tant les interaccions al solc menor de l'ADN com les de tipus intercalant, són determinants per la inhibició de la condensació de la cromatina; mentres que la degradació LMW tan sols s'evita quan l'agent d'unió a l'ADN presenta propietats intercalants. És a dir, sembla que aquestes dades estan recolzant la nostra hipòtesi de considerar l'efecte intercalant a l'ADN de queleritrina com al factor responsable de la inhibició del fenotip apoptòtic. Tot i així, cal dir que la única dada que no correlaciona amb les nostres, és la detecció de la degradació LMW en el cas dels agents d'unió al solc menor de l'ADN. Per altra banda, resulta interessant destacar que alguns estudis estableixen un altre tipus de correlació amb les propietats intercalants de certs tipus d'alcaloides. En concret, alguns autors descriuen que la concentració de protons al medi afavoreix la capacitat d'unió a l'ADN dels alcaloides pertanyents a la família de les benzofenantridines (Bajaj, McLean et al. 1990). Des d'aquest punt de vista, si considerem l'efecte intercalant de l'ADN com a la principal causa de la manca del fenotip apoptòtic en el procés de mort induït per queleritrina, resultaria interessant analitzar el pH de les cèl·lules que estan morint per efecte d'aquest alcaloide. En cas que detectéssim una baixada dràstica d'aquest paràmetre, podríem suggerir un major efecte d'inhibició del fenotip apoptòtic degut a un increment de les propietats intercalants sobre l'ADN per part de queleritrina. Cal afegir, que si seguim considerant l'efecte intercalant a l'ADN de queleritrina com al factor responsable de l'absència del fenotip apoptòtic, hem de remarcar que, llavors, estaríem establint que la inhibició de CAD s'està realitzant en el propi ADN. En aquest sentit, podríem pensar que, malgrat CAD es detecti a la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina, l'efecte intercalant de l'alcaloide podria estar impedit el correcte acomodament de CAD en l'ADN mitjançant

l'estructura de tisora oberta que adopta l'endonucleasa per tal de realitzar la seva activitat (Woo, Kim et al. 2004).

Una altra raó que podria explicar l'absència del fenotip apoptòtic en el procés de mort induït per queleritrina és l'activació prematura de les caspases, ja que aquesta, en conseqüència, acaba implicant també una activació del sistema ICAD·CAD de forma anticipada. De fet, demostrem que l'endarreriment d'aquest tipus d'activació mitjançant el pre-tractament de determinades concentracions de l'antioxidant tiòlic DTT permet recuperar la morfologia apoptòtica però no la degradació oligonucleosomal de l'ADN. Sembla doncs, que l'activació prematura de les caspases podria explicar la manca de la morfologia apoptòtica del procés de mort desencadenat per queleritrina, però no l'absència de la degradació LMW. No obstant, cal dir que varis treballs descriuen processos de mort apoptòtica que succeeixen en absència de la fragmentació apoptòtica de l'ADN (Oberhammer, Wilson et al. 1993; Falcieri, Martelli et al. 1993; Iglesias-Guimaraís, Gil-Guinon et al. 2012). Entre aquests treballs, cal destacar un estudi fet al nostre laboratori en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SK-N-AS, la qual mostra una morfologia apoptòtica tipus II i no manifesta la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN, després de ser tractada amb estaurosporina (Iglesias-Guimaraís, Gil-Guinon et al. 2012). Cal remarcar, que aquest treball demostra que la menor quantitat de CAD present a la fracció citoplasmàtica d'aquestes cèl·lules sense tractar, és la causa per la qual la degradació LMW de l'ADN no es detecta en les cèl·lules SK-N-AS tractades amb l'estímul apoptòtic. De fet, en aquest treball es pot observar com la menor quantitat de CAD detectada a la fracció citoplasmàtica de les cèl·lules sense tractar, no permet adquirir suficients nivells de CAD a la fracció cromatínica d'aquestes cèl·lules, després de ser tractades amb estaurosporina. En aquest aspecte, caldria analitzar la localització subcel·lular de CAD en les condicions de pre-tractament de DTT del procés de mort induït per queleritrina, en les quals s'està induint la morfologia apoptòtica però no la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN. La detecció d'una menor quantitat de CAD en la fracció cromatínica de les cèl·lules tractades amb queleritrina en aquestes condicions de pre-tractament de DTT, podria explicar l'absència de la degradació oligonucleosomal de l'ADN.

No obstant, una altra possible explicació sobre la recuperació incompleta del fenotip apoptòtic del procés de mort desencadenat per queleritrina, a través del tractament amb determinades concentracions de DTT, podria ser la presència de modificacions oxidatives als grups tiols que resultessin ser irreversibles. És a dir, oxidacions addicionals a partir d'una primera oxidació del grup tiol que no podrien evitar-se per antioxidants tiòlics com el DTT (Groeger, Quiney et al. 2009). En aquest sentit, un dany oxidatiu d'aquest tipus que alterés l'activitat de CAD podria ser determinant per la recuperació completa del fenotip apoptòtic. Tot i així, els residus essencials pel manteniment de l'activitat de CAD són 4 residus d'histidina (His242, His263, His308 i His313) altament conservats (Meiss, Scholz et al. 2001; Sakahira, Takemura et al. 2001). No obstant, en el treball del grup de Nagata de caracterització i clonatge molecular de CAD humana, s'analitza la presència dels residus de cisteïna presents en aquesta. En aquest estudi, es mostra que dels 11 residus de cisteïna presents en la CAD humana, 10 estan també presents en la CAD de ratolí (Mukae, Enari et al. 1998). La rellevància biològica d'aquests residus altament conservats no es coneix, però cal remarcar que 3 d'ells (Cys236, Cys307, Cys317) es localitzen a nivell de seqüència propers a 3 dels residus d'histidines essencials pel centre actiu de CAD (His242, His308, His313). En aquest sentit, es podria arribar a pensar que un dany oxidatiu irreversible en algun d'aquests residus de cisteïna, podria està compromentent l'activitat de CAD. De fet, en un altre treball del grup de Nagata, es descriu que ICAD-L permet el correcte plegament de CAD amb tots els residus de cisteïna de l'endonucleasa en un estat tiòlic reduït (Sakahira,

Iwamatsu et al. 2000). Per tant, malgrat els residus de cisteïna no estiguin implicats de forma directa en l'activitat de CAD, l'oxidació dels grups tiols d'aquests residus podria estar alterant el plegament de l'endonucleasa i, en conseqüència, el seu estat funcional. En aquest aspecte, no podríem descartar que, durant el procés de mort induït per queleritrina, s'estigués realitzant alguna oxidació irreversible en algun d'aquests grups tiols, que estigués impeding la recuperació completa del fenotip apoptòtic. No obstant, aquesta hipòtesi és poc probable perquè tots els experiments s'han realitzat amb un pre-tractament de DTT.

Una altra possible raó que podríem suggerir sobre la recuperació incompleta del fenotip apoptòtic en el procés de mort desencadenat per queleritrina amb la presència de determinades concentracions de DTT, seria el manteniment de l'efecte intercalant sobre l'ADN de l'alcaloide en aquestes condicions de tractament. Els nostres resultats apunten a considerar que les propietats intercalants de queleritrina no es perden durant la recuperació del fenotip nuclear apoptòtic. Tot i així, caldria realitzar un estudi més específic d'aquestes propietats d'unió a l'ADN mitjançant, per exemple, un anàlisi de la temperatura de fusió ( $T_m$ ) de l'ADN en presència de queleritrina. De fet, un treball que compara les propietats intercalants de diferents alcaloides, apunta que els compostos amb unes propietats intercalants majors es corresponen amb valors de  $T_m$  més alts (Kamins'kyi, Kryv'iak et al. 2006).

En qualsevol cas, el conjunt de dades suggereix múltiples causes relacionades amb el sistema ICAD·CAD o bé amb les propietats intercalants sobre l'ADN de queleritrina, que poden explicar l'absència del fenotip apoptòtic en el procés de mort desencadenat per l'alcaloide.

#### **4. Interès terapèutic dels BH3 mimètics: queleritrina com a una estratègia d'estudi de processos de mort amb dianes addicionals?**

El disseny de compostos BH3 mimètics és una de les estratègies terapèutiques actuals contra el càncer i que en els darrers anys està adquirint major protagonisme. Aquestes molècules es caracteritzen per unir-se al solc hidrofòbic dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 (Marzo and Naval 2008). La rellevància terapèutica de l'ús dels BH3 mimètics deriva del fet que les cèl·lules cancerígenes sovint expressen nivells elevats d'aquestes proteïnes antiapoptòtiques per evitar la mort cel·lular (Frenzel, Grespi et al. 2009). En conseqüència, el tractament d'aquestes cèl·lules cancerígenes amb compostos BH3 mimètics esdevé una potent estratègia terapèutica.

Queleritrina s'inclou com a BH3 mimètic per la seva capacitat d'inhibir la proteïna antiapoptòtica Bcl- $X_L$  (Chan, Lee et al. 2003). Tenint en compte aquesta dada i el potencial terapèutic dels BH3 mimètics, ens vam plantejar analitzar si la inducció del fenotip nuclear no apoptòtic per part de queleritrina es podia generalitzar amb el fenotip nuclear de mort desencadenat per altres BH3 mimètics. Els nostres resultats mostren que les cèl·lules SH-SY5Y manifesten la morfologia apoptòtica clàssica després del tractament amb els BH3 mimètics emprats. Per tant, aquestes dades demostren que el fenotip nuclear de mort no apoptòtic provocat per queleritrina no es pot considerar com a un tipus de fenotip nuclear induït de forma general pels BH3 mimètics. Per fer un anàlisi d'aquestes dades cal recordar les inhibicions descrites que realitzen cada un dels BH3 mimètics utilitzats. En el cas de TW-37, es considera que aquest inhibeix Bcl-2 i Mcl-1 i, amb menor afinitat, Bcl- $X_L$  (Verhaegen, Bauer et al. 2006; Wang, Azmi et al. 2009; Mohammad, Goustin et al. 2007); obatoclax, tot i ser capaç d'unir-se a tots els membres antiapoptòtics, varis autors esmenten que ho fa amb menys afinitat que TW-37 (per Bcl-2, Bcl- $X_L$  i Mcl-1), ABT-737 (per Bcl-2, Bcl- $X_L$  i Bcl-w) i gossipol (per Bcl-2, Bcl- $X_L$  i Mcl-1) (Wang, Nikolovska-Coleska et

al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006); gossipol, el qual inhibeix Bcl-2 i Mcl-1 i, amb menor afinitat, Bcl-X<sub>L</sub> (Kitada, Leone et al. 2003; Wang, Nikolovska-Coleska et al. 2006; Zhai, Jin et al. 2006); i finalment, pel que fa a ABT-737, aquest inhibeix amb alta afinitat Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>, tot i que alguns autors també consideren que pot inhibir Bcl-w (Zhai, Jin et al. 2006; Bruncko, Oost et al. 2007). Tenint en compte el conjunt d'aquestes dades, ABT-737 és l'únic compost pel qual podríem esperar obtenir una morfologia nuclear semblant a la induïda per queleritrina, ja que és el compost que inhibeix Bcl-X<sub>L</sub> amb més afinitat. Tot i així, cal tenir present que en l'estudi morfològic realitzat amb aquests BH3 mimètics i amb queleritrina, no hem analitzat les diferents inhibicions descrites sobre els membres antiapoptòtics per cada un d'aquests compostos. En aquest sentit i per trobar una explicació als nostres resultats, podríem suggerir que en el cas d'ABT-737, la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub> s'està produint amb més afinitat que en el cas de les cèl·lules tractades amb queleritrina. No obstant, si continuem suggerint que la inhibició de l'alcaloide sobre Bcl-X<sub>L</sub> és poc potent, hauríem de fer l'anàlisi de forma comparativa a la morfologia nuclear induïda pels altres BH3 mimètics (TW-37, gossipol i obatoclox), ja que tots aquests es caracteritzen per inhibir amb baixa afinitat a Bcl-X<sub>L</sub>. Cal recordar, però, que aquests compostos també indueixen en les cèl·lules SH-SY5Y una morfologia apoptòtica. Per tant, no podem suggerir únicament que queleritrina està inhibint Bcl-X<sub>L</sub> de forma menys potent per justificar el fet que el fenotip de mort no apoptòtic induït per l'alcaloide no es manifesti en les cèl·lules tractades amb els altres BH3 mimètics. En conseqüència, tot plegat ens planteja la presència de dianes addicionals a la dels membres antiapoptòtics durant el procés de mort induït per queleritrina que poden portar a què la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub> per part de l'alcaloide no sigui prou rellevant en el procés de mort. En aquest sentit, cal recordar que queleritrina té la capacitat d'intercalar l'ADN i d'inhibir la proteïna PKC (Bai, Zhao et al. 2006; Herbert, Augereau et al. 1990). Tenint en compte aquestes dades, podríem considerar que els BH3 mimètics emprats no indueixen la mateixa morfologia nuclear que queleritrina perquè no presenten les dianes descrites en el cas de l'alcaloide. És a dir, la presència de dianes diferents a la dels membres antiapoptòtics durant el tractament amb queleritrina podria implicar el desencadenament de mecanismes de mort amb diferències prou substancials com per obtenir un fenotip nuclear diferent a l'induït pels altres BH3 mimètics.

Per altra banda, per seguir analitzant la implicació de Bcl-X<sub>L</sub> en el procés de mort induït per queleritrina, cal examinar els resultats obtinguts en els experiments de sobreexpressió d'aquesta proteïna antiapoptòtica en les cèl·lules SH-SY5Y. Cal recordar, que les cèl·lules sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub> tan sols mostren una protecció de la mort provocada per queleritrina entre les 2 i 6h de tractament amb l'alcaloide, obtenint a les 24h, però, nivells de mort similars respecte les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit, pel que en aquest darrer temps la protecció detectada s'acaba perdent. De fet, aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts en un treball de Chan i col·laboradors, en el qual els autors descriuen les cèl·lules sobreexpressores de Bcl-X<sub>L</sub> són resistents a la mort induïda per queleritrina només quan s'estan emprant concentracions baixes de l'alcaloide (Chan, Lee et al. 2003). Per contra, detecten que l'efecte de protecció d'aquesta proteïna antiapoptòtica s'acaba perdent a concentracions majors de tractament amb queleritrina. En qualsevol cas, el conjunt d'aquestes dades estableix que la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub> per part de queleritrina podria no produir-se de forma prou determinant com per evitar el procés de mort cel·lular induït per l'alcaloide en les cèl·lules sobreexpressores d'aquesta proteïna antiapoptòtica. En conseqüència, aquest fet recolza la idea que queleritrina té dianes addicionals a la de la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub> durant el procés de mort induït en les cèl·lules SH-SY5Y. Tenint en compte aquestes consideracions, podríem establir que queleritrina està induint un procés de mort independent de la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub>. De fet, varis treballs abalen que l'únic BH3 mimètic capaç d'induir una mort dependent de la inhibició dels membres antiapoptòtics de Bcl-2 és ABT-737 i la seva forma oral



ABT-263 (van Delft, Wei et al. 2006; Tse, Shoemaker et al. 2008; Vogler, Weber et al. 2009). És més, un treball de Vogler i col·laboradors determina que queleritrina està desencadenant un procés de mort independent de la inhibició de Bcl-X<sub>L</sub> i els autors justifiquen aquest fet per la presència de dianes addicionals (Vogler, Weber et al. 2009). Per altra banda, cal tenir en compte que en el context dels BH3 mimètics, s'estan creant compostos que inhibeixen a Bcl-X<sub>L</sub> i Bcl-2 amb afinitats d'unió 10.000 vegades més altes que la d'altres compostos dissenyats prèviament (Zhou, Chen et al. 2012). A més a més, s'estan cercant compostos que inhibeixin de forma selectiva a Bcl-2 sense afectar a Bcl-X<sub>L</sub>, com l'ABT-199 (Souers, Levenson et al. 2013), o només Bcl-X<sub>L</sub>, com el compost WEHI-539 (Lessene, Czabotar et al. 2013). Tot plegat, recolza la rellevància de trobar compostos BH3 mimètics que indueixin processos de mort dependents únicament de les inhibicions dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 sense la presència de dianes addicionals, ja que es considera que hi ha menys probabilitat que es desencadeni una mort cel·lular no controlada amb efectes tòxics no desitjats (Vogler, Weber et al. 2009). En aquest sentit, el procés de mort induït per queleritrina pot esdevenir una estratègia d'estudi per aquells processos de mort desencadenats per BH3 mimètics que presentin efectes tòxics no previstos donats per la presència d'altres dianes diferents a la dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2.

Per últim, m'agradaria remarcar que, malgrat el potent efecte vist *in cellula* de queleritrina, resulta curiós que no s'hagi reportat en la literatura dades sobre l'avanç terapèutic d'aquest agent citotòxic dins del context clínic. Podria ser possible que el compost s'hagi descartat per la inducció d'un procés de mort poc controlat i, en conseqüència, amb efectes tòxics no desitjats tal i com va succeir de forma similar, pel cas d'estaurosporina. Tot i així, en el cas d'aquesta última s'han arribat a dissenyar molècules similars a una part concreta de l'alcaloide, que resulta determinant en la inducció de processos de diferenciació neuronal (Thompson and Levin 2010). En aquest sentit, podria ser que en el cas de queleritrina s'estiguessin dissenyant anàlegs estructurals per una aplicació terapèutica concreta. Caldrà esperar, doncs, per veure si realment aquest compost pot destacar en el context terapèutic.

## 5. Conseqüències biològiques del fenotip de mort

Malgrat que dins de l'àmbit clínic no s'explori amb prou detall sobre altres processos de mort diferents a l'apoptosi, ni s'aprofunditzi sobre la manifestació completa dels *hallmarks* apoptòtics, varis treballs estableixen una relació entre el tipus de fenotip de mort induït pels quimioteràpics i els posteriors esdeveniments cel·lulars que tenen lloc en el microambient cel·lular tractat (Peitsch, Mannherz et al. 1994; Herrmann, Voll et al. 1998; Holmgren, Bergsmedh et al. 2002; Holmgren, Szeles et al. 1999; Bergsmedh, Szeles et al. 2001; Yan, Wang et al. 2006). D'entrada, analitzarem quines són les principals valoracions establertes des d'aquest punt de vista, per tal de poder discutir posteriorment quines implicacions biològiques podria tenir una inducció d'un fenotip de mort com el de queleritrina, en un context de tractament quimioteràpic.

La principal relació establerta rau en la rellevància biològica de la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN. Tot i que la informació en la literatura sobre aquest aspecte és escassa, es considera que la degradació de la cromatina en fragments de baix pes molecular pot conferir trets biològics tant positius com negatius per l'organisme. D'una banda, dins d'un dels aspectes positius, es considera que la degradació oligonucleosomal de l'ADN afavoreix l'activitat fagocítica de les cèl·lules sanes, properes a la zona apoptòtica. És a dir, la fragmentació de la cromatina en els cossos apoptòtics facilita l'activitat de les cèl·lules fagocítiques i, en conseqüència, es dificulta l'aparició de processos inflamatoris (Peitsch, Mannherz et al. 1994). En

aquest sentit, la circulació en sang de nucleosomes lliures, o bé de cromatina parcialment degradada, pot provocar la generació d'autoanticossos, ja que són potents immunògens; desencadenant, així, malalties autoimmunes com, per exemple, SLE (*systemic lupus erythematosus*) (Herrmann, Voll et al. 1998). D'altra banda, la literatura recull aspectes negatius relacionats amb la fagocitosi dels cossos apoptòtics i la transferència horitzontal gènica, HGT (*horizontal gene transfer*). L'HGT implica el moviment d'un segment d'ADN des d'una cèl·lula donadora cap a una cèl·lula receptora, i la seva posterior integració de forma estable al genoma d'aquesta última. Varis treballs descriuen que aquest procés es dona durant la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques tumorals, duta a terme per les cèl·lules veïnes sanes, properes al microambient apoptòtic (Holmgren, Bergsmedh et al. 2002; Holmgren, Szeles et al. 1999; Bergsmedh, Szeles et al. 2001; Yan, Wang et al. 2006). En un context apoptòtic tumoral, doncs, la principal conseqüència biològica de l'execució d'aquest fenomen deriva de la transferència d'oncogens potencials provinents de la cèl·lula tumoral donadora cap a cèl·lules receptores fagocítiques sanes (Bergsmedh, Szeles et al. 2001). A més a més, s'ha suggerit que els fragments d'ADN més petits, generats durant la mort apoptòtica, podrien integrar-se més fàcilment en el genoma de la cèl·lula receptora (Yan, Wang et al. 2006). Tot i així, malgrat que el fenomen HGT pugui promoure la transformació cel·lular i la tumorogènesi, la transferència d'ADN per HGT al genoma de les cèl·lules fagocítiques, es descriu amb una detecció del 15% d'aquestes cèl·lules i la seva execució de forma eficient s'observa amb una freqüència baixa (Holmgren, Szeles et al. 1999); (Yan, Wang et al. 2006). Per altra banda, un treball de Yan i col·laboradors relaciona la inhibició funcional de CAD amb una menor execució del fenomen HGT. Així, en cèl·lules amb l'endonucleasa activa, la degradació oligonucleosomal de l'ADN facilita la transferència gènica de les cèl·lules apoptòtiques a les fagocítiques (Yan, Wang et al. 2006). No obstant, cal remarcar que l'efecte final de CAD en la fragmentació oligonucleosomal de l'ADN es valora en varis treballs amb una inhibició del desenvolupament del tumor (Bergsmedh, Szeles et al. 2001; Yan, Wang et al. 2006; Yan, Wang et al. 2006). És a dir, es considera una funció supressora tumoral de l'endonucleasa i aquest fet és encara més remarcable si es té present que la fragmentació de l'ADN induïda per CAD s'executa en les etapes finals de la mort apoptòtica, en les que sembla que un defecte en l'activació de l'endonucleasa no ha de tenir cap impacte en la tumorogènesi.

En relació a les implicacions biològiques que podria tenir el fenotip de mort induït per queleritrina, d'entrada cal recordar que aquest es desencadena en absència dels *hallmarks* apoptòtics i, per tant, de forma contrària a l'induït per estaurosporina. Per aquesta raó, resulta interessant analitzar de forma comparativa les implicacions biològiques que poden tenir els fenotips de mort provocats per aquests dos estímuls citotòxics.

Pel que fa a les implicacions biològiques relacionades amb la fragmentació de l'ADN, les valoracions fetes anteriorment ens permeten considerar que sembla preferible intentar induir la màxima fragmentació de l'ADN possible. En el cas d'estaurosporina, la degradació de la cromatina en els cossos apoptòtics permetria afavorir la fagocitosi d'aquests i la desaparició total de les restes cel·lulars tumorals reduint el risc d'aparició de processos inflamatoris. No obstant, caldria considerar si l'ambient cel·lular tumoral es troba en un context d'activitat fagocítica i si el fenomen HGT pot succeir. És a dir, podríem descartar una fragmentació apoptòtica de l'ADN, ja fos perquè aquesta es podria considerar com a no necessària donada una activitat fagocítica mínima en el microambient tumoral a tractar, o bé, perquè es detectés un alt risc del fenomen HGT amb, per tant, possibles conseqüències de contribució a la transformació neoplàsica. En qualsevol dels casos, si finalment es descartés la fragmentació de l'ADN i s'optés, per tant, per la inducció d'un fenotip de mort semblant al de queleritrina, caldria també tenir en compte el desencadenament de processos

immunogènics, donat que llavors s'estaria afavorint la presència de nucleosomes intactes. En aquest punt doncs, caldria intentar induir una mort sense fragmentació de l'ADN, però evitant l'alliberament del material genètic a l'espai extracel·lular. En aquest sentit, cal remarcar que en el cas de processos de mort com queleritrina caldria determinar si s'està alliberant ADN a l'espai extracel·lular, per tal de poder acabar d'establir la conveniència biològica sobre la inducció d'un fenotip de mort d'aquest tipus.

Per altra banda, si tenim en compte que el fenotip de mort pot dependre d'una activació prematura de caspases, com és el cas de queleritrina, d'entrada cal considerar que aquesta no sempre es correlaciona amb la inducció d'alts nivells de mort. Varis estudis descriuen aquest fenomen com a un esdeveniment independent de l'apoptosi i amb una implicació fisiològica, donat que l'activació anticipada de les caspases s'ha arribat a detectar en processos d'estimulació de limfòcits T, cèl·lules pancreàtiques i plaquetes (Alam, Cohen et al. 1999; Rosado, Lopez et al. 2006). Des d'aquest punt de vista, l'estudi dels mecanismes implicats en l'activació prematura de les caspases a través del procés de mort induït per queleritrina prén major rellevància. És a dir, l'estudi d'aquests mecanismes pot contribuir en distingir quan els efectes biològics finals poden estar lligats a una potent inducció de mort cel·lular o bé, poden tenir alguna implicació fisiològica que podria comprometre l'eficàcia terapèutica de l'agent citotòxic. Per altra banda, és important remarcar que s'ha establert una relació entre un determinat efecte biològic del microambient tumoral tractat i l'activació de caspases de processos de mort desencadenats per radioteràpia. Varis estudis demostren que l'activació de les caspases efectores -3 i -7 en cèl·lules tumorals que estan morint per apoptosi, pot desencadenar mecanismes de senyalització paracrina amb efectes de repoblament cel·lular en cèl·lules properes a aquestes (Huang, Li et al. 2011; Kim, Moretti et al. 2008). En conseqüència, l'efecte final d'aquest procés es pot traduir amb una acceleració de la proliferació cel·lular de les cèl·lules tumorals veïnes a les apoptòtiques, que han resistit a la radioteràpia. De forma més concreta, Huang i col·laboradors descriuen que en un model xenograft de ratolí amb cèl·lules derivades de càncer de mama MCF-7 expressores de caspasa-3, els tumors creixen més ràpidament i són significativament més resistents a la radioteràpia que en el xenograft amb cèl·lules MCF-7 wt, les quals, de forma natural, són deficientes en caspasa-3 (Huang, Li et al. 2011). De la mateixa manera, els mateixos autors detecten que mostres clíniques procedents de pacients amb càncer amb alts nivells d'activació de caspasa-3 es correlacionen amb una reparació del tumor i un temps de supervivència curt en els pacients. A més a més, l'estudi de Huang i col·laboradors, relaciona aquest efecte paracrí de l'activació de caspasa-3 amb la secreció al medi extracel·lular de la prostaglandina PGE<sub>2</sub>, la qual pot promoure el creixement cel·lular de les cèl·lules veïnes a través de la via de senyalització de la  $\beta$ -catenina (Huang, Li et al. 2011; Castellone, Teramoto et al. 2005). Tot i que aquest efecte biològic només s'ha analitzat en el context radioteràpic, si estiguéssim valorant la inducció d'un procés de mort tumoral amb un agent citotòxic com queleritrina, hauríem de tenir present la possibilitat del desencadenament d'aquest tipus d'esdeveniments paracrins, donada la capacitat d'inducció d'una forta activació de caspases per part de l'alcaloide. És a dir, malgrat existís una correlació positiva entre un potent nivell de mort i l'activació de caspases de l'agent quimioteràpic, caldria analitzar abans de la realització del tractament, si aquest compost està induint la secreció d'algun mediador al medi extracel·lular com PEG2 que pogués estar promovent el creixement de les cèl·lules veïnes. La realització d'aquest anàlisi hauria de ser indispensable, ja que un tractament associat a aquests mecanismes tindria l'alt risc d'induir un repoblament cel·lular en les cèl·lules malignes que han sobreviscut al tractament quimioteràpic agreujant, en conseqüència, els problemes de resistència quimioteràpica. De fet, un treball de Kim i col·laboradors mostra com en un model de xenograft de càncer de pulmó en ratolí, la combinació de radioteràpia amb un nou inhibidor químic de caspasa-3 (M867), redueix

significativament el creixement i la vascularització dels tumors en comparació als seus controls (Kim, Moretti et al. 2008). Per tant, si un fenotip de mort com el de queleritrina, depenent d'una forta activació de caspases, estigués desencadenant un efecte biològic d'aquest tipus, caldria valorar el tractament d'un agent quimioteràpic que prescindís de l'activació de caspases, però que fos igualment potent a nivell d'inducció de mort cel·lular tumoral.

Tenint en compte aquestes darreres dades, hem de considerar que l'efecte biològic derivat d'aquesta senyalització paracrina trenca amb la concepció clàssica d'associar una forta activació de caspasa-3 i -7 amb una bona resposta terapèutica del tumor. Queda encara per veure fins a quin punt, en futurs estudis pre-clínic i clínic, l'activació d'aquestes caspases efectores pot accelerar la repoblació dels tumors i inclús, en quin grau poden arribar a esdevenir importants biomarcadors de resistència a la teràpia antitumoral. En aquest sentit, caldria analitzar l'efecte d'aquest mecanisme de senyalització paracrina en les quimioteràpies actuals existents i explorar si es tracta d'un efecte específic d'aquestes caspases efectores. Tot i així, sembla que la inhibició d'aquest mecanisme és especialment rellevant en els tumors més quimioresistents.

Analitzades totes les possibles implicacions biològiques derivades tant del procés de mort cel·lular manifestat per queleritrina, com de l'induït per estaurosporina, d'entrada no es pot definir un únic fenotip de mort com al més favorable a nivell biològic dins d'un context tumoral, donat que s'han de tenir en compte múltiples factors derivats d'aquest i, aleshores, establir quin tipus de mort podria ser la més òptima. En resum, tot plegat ens planteja que no solament resulta determinant conèixer els mecanismes moleculars decisius en l'adquisició d'un tipus de fenotip de mort o altre, sinó que cal valorar l'aplicació d'aquests processos en el context tumoral i tenir en compte, no solament les particularitats i principals característiques cel·lulars del propi tumor, sinó també les condicions fisiològiques del microambient tumoral. El coneixement i anàlisi dels possibles efectes biològics derivats d'un fenotip de mort podrien arribar a contribuir en l'ús de teràpies que provoquin la mort de la cèl·lula tumoral més favorable per a cada cas clínic.

## **VIII. CONCLUSIONS**





**Primera.** Queleritrina provoca un procés de mort cel·lular homogeni caracteritzat per un fenotip nuclear no apoptòtic en diferents línies cel·lulars derivades de neuroblastoma humà.

**Segona.** La morfologia nuclear no apoptòtica desencadenada per queleritrina no és induïda per altres BH3 mimètics.

**Tercera.** El fenotip nuclear induït per queleritrina no s'altera en funció de la concentració citotòxica emprada.

**Quarta.** Queleritrina provoca degradació de l'ADN en fragments d'alt pes molecular, però no en fragments oligonucleosomals.

**Cinquena.** Queleritrina induïx l'activació de les caspases i l'alliberament de factors mitocondrials pro-apoptogènics al citosol.

**Sisena.** El fenotip de mort no apoptòtic provocat per queleritrina es manifesta de forma prematura i depenent de l'activació anticipada de les caspases, en un procés de mort cel·lular que s'executa ràpidament.

**Setena.** Un increment en els nivells d'expressió de Bcl-X<sub>L</sub> no evita la mort cel·lular induïda per queleritrina en les cèl·lules SH-SY5Y.

**Vuitena.** ICAD es processa correctament després del tractament amb queleritrina i l'expressió forçada d'ICAD-L no restableix la morfologia nuclear apoptòtica.

**Novena.** L'expressió forçada de CAD no recupera el fenotip apoptòtic després de tractar les cèl·lules amb queleritrina.

**Desena.** CAD no pateix cap procés de degradació proteïca i es localitza a la fracció cromatínica en les cèl·lules tractades amb queleritrina.

**Onzena.** Queleritrina impedeix el fenotip apoptòtic induït per estaurosporina malgrat CAD es trobi a la fracció cromatínica.

**Dotzena.** Diferents agents d'unió a l'ADN inhibeixen l'aparició del fenotip apoptòtic provocat per estaurosporina, malgrat no alterin l'activació de caspasa-3.

**Tretzena.** L'activació prematura de les caspases es desencadena per compostos pertanyents a la família de les benzofenantridines amb propietats intercalants sobre l'ADN.

**Catorzena.** Diversos antioxidants tiòlics i un inhibidor de la necroptosi eviten tant el procés de mort cel·lular com l'activació de caspases induïda per queleritrina.

**Quinzena.** El procés de mort cel·lular desencadenat per queleritrina provoca estrés oxidatiu en un elevat percentatge de cèl·lules de forma prematura en el temps de tractament.

**Setzena.** L'addició de determinades concentracions de DTT (*dithiothreitol*) al medi de cultiu permeten retardar l'activació de les caspases i recuperar el fenotip nuclear apoptòtic, però no la degradació oligonucleosomal de l'ADN, en el procés de mort induït per queleritrina.

**Dissetena.** La morfologia apoptòtica induïda per queleritrina en presència de determinades concentracions de DTT al medi de cultiu es manifesta malgrat es mantinguin les propietats intercalants de l'alcaloide sobre l'ADN.



## **IX. BIBLIOGRAFIA**





- Abi Abdallah, D. S. and E. Y. Denkers (2012). "Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites." Front Immunol **3**: 382.
- Ahn, J. Y., X. Liu, et al. (2005). "Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD." Mol Cell **18**(4): 435-45.
- Ahn, J. Y., X. Liu, et al. (2006). "Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase." EMBO J **25**(10): 2083-95.
- Alam, A., L. Y. Cohen, et al. (1999). "Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells." J Exp Med **190**(12): 1879-90.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Altairac, S., S. Zeggai, et al. (2003). "Apoptosis induced by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway." Cell Death Differ **10**(5): 548-57.
- Andrabi, S. A., T. M. Dawson, et al. (2008). "Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos." Ann N Y Acad Sci **1147**: 233-41.
- Anonick, P. K. and S. L. Gonias (1991). "Soluble fibrin preparations inhibit the reaction of plasmin with alpha 2-macroglobulin. Comparison with alpha 2-antiplasmin and leupeptin." Biochem J **275** ( Pt 1): 53-9.
- Arnheim, G. (1890). "Coagulations nekrose und Kernschwund." Virchows Arch Pathol Anat **120**: 367-383.
- Bagnoli, M., S. Canevari, et al. (2009). "Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer." Int J Biochem Cell Biol **42**(2): 210-3.
- Baguley, B. C. (1991). "DNA intercalating anti-tumour agents." Anticancer Drug Des **6**(1): 1-35.
- Bai, J. Z., E. L. Saafi, et al. (1999). "Role of Ca<sup>2+</sup> in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet beta-cells." Biochem J **343** Pt 1: 53-61.
- Bai, L. P., Z. Z. Zhao, et al. (2006). "DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine." Bioorg Med Chem **14**(16): 5439-45.
- Bajaj, N. P., M. J. McLean, et al. (1990). "Sequence-selective, pH-dependent binding to DNA of benzophenanthridine alkaloids." J Mol Recognit **3**(1): 48-54.
- Baker, B. R. and M. Cory (1971). "Irreversible enzyme inhibitors. 180. Irreversible inhibitors of the C'la component of complement derived from m-(phenoxypropoxy)benzamidine and phenoxyacetamide." J Med Chem **14**(2): 119-25.
- Bano, D., K. W. Young, et al. (2005). "Cleavage of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in excitotoxicity." Cell **120**(2): 275-85.
- Barrett, A. J., A. A. Kembhavi, et al. (1982). "L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L." Biochem J **201**(1): 189-98.
- Barry, M. A. and A. Eastman (1993). "Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis." Arch Biochem Biophys **300**(1): 440-50.
- Barry, M. A., J. E. Reynolds, et al. (1993). "Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification." Cancer Res **53**(10 Suppl): 2349-57.
- Beaulaton, J. and R. A. Lockshin (1982). "The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification." Int Rev Cytol **79**: 215-35.
- Becattini, B., S. Kitada, et al. (2004). "Rational design and real time, in-cell detection of the proapoptotic activity of a novel compound targeting Bcl-X(L)." Chem Biol **11**(3): 389-95.

- Belmokhtar, C. A., A. Torriglia, et al. (2000). "Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity." Exp Cell Res **254**(1): 99-109.
- Bergsmeth, A., A. Szeles, et al. (2001). "Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6407-11.
- Berman, H. M. and P. R. Young (1981). "The interaction of intercalating drugs with nucleic acids." Annu Rev Biophys Bioeng **10**: 87-114.
- Bernardi, P., S. Vassanelli, et al. (1992). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations." J Biol Chem **267**(5): 2934-9.
- Bertrand, R., E. Solary, et al. (1994). "Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine." Exp Cell Res **211**(2): 314-21.
- Berube, C., L. M. Boucher, et al. (2005). "Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14314-20.
- Bishop, N. and P. Woodman (2001). "TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes." J Biol Chem **276**(15): 11735-42.
- Black, R. A., S. R. Kronheim, et al. (1989). "A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta." J Biol Chem **264**(10): 5323-6.
- Boix, J., N. Llecha, et al. (1997). "Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines." Neuropharmacology **36**(6): 811-21.
- Boldin, M. P., I. L. Mett, et al. (1995). "Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects." J Biol Chem **270**(1): 387-91.
- Boss, J. (1955). "Mitosis in cultures of newt tissues. IV. The cell surface in late anaphase and the movements of ribonucleoprotein." Exp Cell Res **8**(1): 181-7.
- Boulares, A. H., A. J. Zoltoski, et al. (2002). "Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADP-ribose) during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation." J Biol Chem **277**(1): 372-8.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt, et al. (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-62.
- Bromme, D., A. Steinert, et al. (1989). "The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B." Biochem J **264**(2): 475-81.
- Bruncko, M., T. K. Oost, et al. (2007). "Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL." J Med Chem **50**(4): 641-62.
- Bursch, W., A. Ellinger, et al. (1996). "Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy." Carcinogenesis **17**(8): 1595-607.
- Cabrespine, A., J. O. Bay, et al. (2005). "In vitro assessment of cytotoxic agent combinations for hormone-refractory prostate cancer treatment." Anticancer Drugs **16**(4): 417-22.
- Carp, H., F. Miller, et al. (1982). "Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(6): 2041-5.
- Caserta, T. M., A. N. Smith, et al. (2003). "Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties." Apoptosis **8**(4): 345-52.
- Castellone, M. D., H. Teramoto, et al. (2005). "Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-

- axin-beta-catenin signaling axis." Science **310**(5753): 1504-10.
- Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, et al. (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme." Science **256**(5053): 97-100.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) **181**(3): 195-213.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, et al. (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." Nat Cell Biol **3**(4): 339-45.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Costantini, P., A. S. Belzacq, et al. (2000). "Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis." Oncogene **19**(2): 307-14.
- Costero, I. and C. M. Pomerat (1951). "Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex." Am J Anat **89**(3): 405-67.
- Cotgreave, I. A. and P. Moldeus (1987). "Lung protection by thiol-containing antioxidants." Bull Eur Physiopathol Respir **23**(4): 275-7.
- Counis, M. F., E. Chaudun, et al. (1998). "Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation." Cell Death Differ **5**(4): 251-61.
- Crook, N. E., R. J. Clem, et al. (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-74.
- Cross, A. R. and O. T. Jones (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta **1057**(3): 281-98.
- Cross, J. V. and D. J. Templeton (2006). "Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1819-27.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." Genes Dev **12**(11): 1551-70.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." Nature **406**(6798): 855-62.
- Chan, S. L., M. C. Lee, et al. (2003). "Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function." J Biol Chem **278**(23): 20453-6.
- Chang, Y. C., F. R. Chang, et al. (2003). "Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*." Z Naturforsch C **58**(7-8): 521-6.
- Charras, G. T. (2008). "A short history of blebbing." J Microsc **231**(3): 466-78.
- Chaudhary, P. M., M. Eby, et al. (1997). "Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway." Immunity **7**(6): 821-30.
- Chen, D., R. A. Stetler, et al. (2000). "Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/Inhibitor of caspase-activated DNase (Short form). The endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal apoptosis." J Biol Chem **275**(49): 38508-17.
- Chen, J. J., H. Bertrand, et al. (1995). "Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products." Free Radic Biol Med **19**(5): 583-90.
- Chen, K. L., W. S. Chang, et al. (2011). "Targeting cathepsin S induces tumor cell autophagy via the EGFR-ERK signaling pathway." Cancer Lett **317**(1): 89-98.
- Cheung, W. L., K. Ajiro, et al. (2003). "Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase." Cell **113**(4): 507-17.
- Chi, S., C. Kitanaka, et al. (1999). "Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells." Oncogene **18**(13): 2281-90.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and

- initiates apoptosis." *Cell* **81**(4): 505-12.
- Chmura, S. J., M. E. Dolan, et al. (2000). "In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo." *Clin Cancer Res* **6**(2): 737-42.
- Cho, S. G., J. W. Kim, et al. (2003). "Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities." *J Cell Biol* **163**(1): 71-81.
- Cho, Y., T. McQuade, et al. (2011). "RIP1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in necrosis and T cell activation." *PLoS One* **6**(8): e23209.
- Cho, Y. S., S. Challa, et al. (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." *Cell* **137**(6): 1112-23.
- Choi, J. W., S. B. Lee, et al. (2008). "Disruption of ATP binding destabilizes NPM/B23 and inhibits anti-apoptotic function." *BMB Rep* **41**(12): 840-5.
- Choi, Y. E., M. Butterworth, et al. (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): 12772-82.
- De Duve, C. and H. Beaufay (1959). "Tissue fractionation studies. 10. Influence of ischaemia on the state of some bound enzymes in rat liver." *Biochem J* **73**: 610-6.
- Debiton, E., J. C. Madelmont, et al. (2003). "Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion." *Cancer Chemother Pharmacol* **51**(6): 474-82.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-67.
- Degterev, A., J. Hitomi, et al. (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." *Nat Chem Biol* **4**(5): 313-21.
- Degterev, A., Z. Huang, et al. (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." *Nat Chem Biol* **1**(2): 112-9.
- Degterev, A., A. Lugovskoy, et al. (2001). "Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL." *Nat Cell Biol* **3**(2): 173-82.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 378-90.
- Denecker, G., E. Hoste, et al. (2007). "Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss." *Nat Cell Biol* **9**(6): 666-74.
- Denecker, G., D. Vercammen, et al. (2001). "Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria." *Cell Death Differ* **8**(8): 829-40.
- Dizdaroğlu, M. (2012). "Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease." *Cancer Lett* **327**(1-2): 26-47.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Dyrbukt, J. M., M. Ankarcróna, et al. (1994). "Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines." *J Biol Chem* **269**(48): 30553-60.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." *J Biol Chem* **281**(6): 3254-60.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, et al. (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." *EMBO Rep* **7**(10): 988-94.
- Eckhart, L., C. Ballaun, et al. (2005). "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity." *J Biol Chem* **280**(42): 35077-80.
- Eguchi, Y., S. Shimizu, et al. (1997). "Intracellular ATP levels determine

- cell death fate by apoptosis or necrosis." *Cancer Res* **57**(10): 1835-40.
- Ekert, P. G., J. Silke, et al. (1999). "Caspase inhibitors." *Cell Death Differ* **6**(11): 1081-6.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." *Cell* **44**(6): 817-29.
- Ellis, R. E., D. M. Jacobson, et al. (1991). "Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **129**(1): 79-94.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan, et al. (1991). "Mechanisms and functions of cell death." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-98.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Eom, Y. W., M. A. Kim, et al. (2005). "Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype." *Oncogene* **24**(30): 4765-77.
- Fagian, M. M., L. Pereira-da-Silva, et al. (1990). "Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants." *J Biol Chem* **265**(32): 19955-60.
- Falcieri, E., A. M. Martelli, et al. (1993). "The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation." *Biochem Biophys Res Commun* **193**(1): 19-25.
- Feng, S., Y. Yang, et al. (2007). "Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain." *Cell Signal* **19**(10): 2056-67.
- Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, et al. (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): 30761-4.
- Fernandes-Alnemri, T., J. Wu, et al. (2007). "The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation." *Cell Death Differ* **14**(9): 1590-604.
- Fischer, U. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Apoptosis-based therapies and drug targets." *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**: 942-61.
- Flemming, W. (1885). "Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel." *Arch Anat Physiol*: 221-244.
- Fox, K. R. and M. J. Waring (1984). "DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin as revealed by DNAase I footprinting." *Nucleic Acids Res* **12**(24): 9271-85.
- Frassetto, L. J., C. R. Schlieve, et al. (2006). "Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(1): 427-38.
- Frenzel, A., F. Grespi, et al. (2009). "Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer." *Apoptosis* **14**(4): 584-96.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." *Science* **201**(4359): 875-80.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-32.
- Galonek, H. L. and J. M. Hardwick (2006). "Upgrading the BCL-2 network." *Nat Cell Biol* **8**(12): 1317-9.
- Galogly, M. M. and J. J. Miesal (2007). "Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress." *Curr Opin Pharmacol* **7**(4): 381-91.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**(1): 107-20.

- Gao, X. L. and D. J. Patel (1989). "Solution structure of the chromomycin-DNA complex." Biochemistry **28**(2): 751-62.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, et al. (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." J Biol Chem **273**(49): 32608-13.
- Garrido, C. and G. Kroemer (2004). "Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 639-46.
- Giles, G. I., K. M. Tasker, et al. (2001). "Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress." Free Radic Biol Med **31**(10): 1279-83.
- Gillespie, S. K., X. D. Zhang, et al. (2004). "Ingenol 3-angelate induces dual modes of cell death and differentially regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in melanoma cells." Mol Cancer Ther **3**(12): 1651-8.
- Glucksmann, A. (1951). "Cell deaths in normal vertebrate ontogeny." Biol Rev Camb Philos Soc **26**: 59-86.
- Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." Oncogene **29**(34): 4752-65.
- Graham, J., M. Mushin, et al. (2004). "Oxaliplatin." Nat Rev Drug Discov **3**(1): 11-2.
- Grafer, L. (1914). "Eine neue Anschauung Oberphysiologische Zellausschaltung Arch Zellforsch." **12**: 373-394.
- Groeger, G., C. Quiney, et al. (2009). "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2655-71.
- Gu, J., R. P. Dong, et al. (1999). "Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40." J Biol Chem **274**(30): 20759-62.
- Guenebeaud, C., D. Goldschneider, et al. (2010). "The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase." Mol Cell **40**(6): 863-76.
- Guilly, M. N., A. Bensussan, et al. (1987). "A human T lymphoblastic cell line lacks lamins A and C." EMBO J **6**(12): 3795-9.
- Ha, H. C. and S. H. Snyder (1999). "Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13978-82.
- Hahn, H., D. Farber, et al. (1994). "[Possible errors in ultrasound hip imaging in patients with osteogenesis imperfecta]." Ultraschall Med **15**(6): 282-5.
- Halawani, D., S. Tessier, et al. (2010). "Identification of Caspase-6-mediated processing of the valosin containing protein (p97) in Alzheimer's disease: a novel link to dysfunction in ubiquitin proteasome system-mediated protein degradation." J Neurosci **30**(17): 6132-42.
- Halenbeck, R., H. MacDonald, et al. (1998). "CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45." Curr Biol **8**(9): 537-40.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge, et al. (1985). "Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 659-71.
- Hampton, M. B., B. Fadeel, et al. (1998). "Redox regulation of the caspases during apoptosis." Ann N Y Acad Sci **854**: 328-35.
- Hampton, M. B. and S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett **414**(3): 552-6.
- Han, S. I., Y. S. Kim, et al. (2008). "Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions." BMB Rep **41**(1): 1-10.
- Harth, G., N. Andrews, et al. (1993). "Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 17-24.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of



- apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-8.
- 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): 665-76.
- Herbert, J. M., J. M. Augereau, et al. (1990). "Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C." Biochem Biophys Res Commun **172**(3): 993-9.
- Herrmann, M., R. E. Voll, et al. (1998). "Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **41**(7): 1241-50.
- Hitomi, J., D. E. Christofferson, et al. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." Cell **135**(7): 1311-23.
- Holmgren, L., A. Bergsmedh, et al. (2002). "Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies." Vox Sang **83 Suppl 1**: 305-6.
- Holmgren, L., A. Szeles, et al. (1999). "Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies." Blood **93**(11): 3956-63.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-95.
- Hornung, J. P., H. Koppel, et al. (1989). "Endocytosis and autophagy in dying neurons: an ultrastructural study in chick embryos." J Comp Neurol **283**(3): 425-37.
- Houghton, J. A. (1999). "Apoptosis and drug response." Curr Opin Oncol **11**(6): 475-81.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Hualei, L. (2003). "Dithiothreitol (Cleland's Reagent)." Free Radical and Radiation Biology Program
- Huang, H., C. A. Joazeiro, et al. (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): 26661-4.
- Huang, Q., F. Li, et al. (2011). "Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy." Nat Med **17**(7): 860-6.
- Huang, Y., R. L. Rich, et al. (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): 49517-22.
- Hugon, J. S., G. Bennett, et al. (1987). "Loss of microtubules and alteration of glycoprotein migration in organ cultures of mouse intestine exposed to nocodazole or colchicine." Cell Tissue Res **248**(3): 653-62.
- Hunter, A. M., D. Kottachchi, et al. (2003). "A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO." J Biol Chem **278**(9): 7494-9.
- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." Science **275**(5296): 90-4.
- Iglesias-Guimaraes, V., E. Gil-Guinon, et al. (2012). "Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease." J Biol Chem **287**(10): 7766-79.
- Iglesias-Guimaraes, V., E. Gil-Guinon, et al. (2013). "Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks." J Biol Chem **288**(13): 9200-15.
- Iguchi, K., K. Hirano, et al. (2002). "Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells." J Biochem **131**(3): 469-75.

- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1999). "Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD." J Biol Chem **274**(1): 270-4.
- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1998). "CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor." EMBO J **17**(9): 2526-33.
- Jaattela, M. and J. Tschopp (2003). "Caspase-independent cell death in T lymphocytes." Nat Immunol **4**(5): 416-23.
- Jacobs, B. and J. H. Kronman (1977). "The zygomatic arch and its possible influence on craniofacial growth and development." Angle Orthod **47**(2): 136-40.
- Jacobson, M. D., J. F. Burne, et al. (1993). "Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA." Nature **361**(6410): 365-9.
- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Jacoby, M. (1900). "Über die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber." Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem **30**: 149-159.
- Jain, S. C., C. C. Tsai, et al. (1977). "Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium:5-iodocytidylyl (3'-5') guanosine." J Mol Biol **114**(3): 317-31.
- Janicke, R. U., P. Ng, et al. (1998). "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis." J Biol Chem **273**(25): 15540-5.
- Joza, N., G. Kroemer, et al. (2002). "Genetic analysis of the mammalian cell death machinery." Trends Genet **18**(3): 142-9.
- Kagan, V. E., V. A. Tyurin, et al. (2005). "Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors." Nat Chem Biol **1**(4): 223-32.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- Kamins'kyi, V. O., N. V. Kryv'iak, et al. (2006). "[Effect of alkaloids from celandine on calcium accumulation and oxidative phosphorylation in mitochondria depending on their DNA intercalating properties]." Ukr Biokhim Zh **78**(2): 73-8.
- Kang, T. B., G. S. Oh, et al. (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): 2522-32.
- Karaman, M. W., S. Herrgard, et al. (2008). "A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity." Nat Biotechnol **26**(1): 127-32.
- Kawane, K., H. Fukuyama, et al. (1999). "Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes." Cell Death Differ **6**(8): 745-52.
- Kawane, K., H. Fukuyama, et al. (2001). "Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver." Science **292**(5521): 1546-9.
- Kawane, K., H. Fukuyama, et al. (2003). "Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation." Nat Immunol **4**(2): 138-44.
- Kerr, J. F. (1971). "Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death." J Pathol **105**(1): 13-20.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, K. W., L. Moretti, et al. (2008). "M867, a novel selective inhibitor of caspase-3 enhances cell death and extends tumor growth delay in irradiated lung cancer models." PLoS One **3**(5): e2275.
- Kim, S. K. and B. Norden (1993). "Methyl green. A DNA major-groove binding drug." FEBS Lett **315**(1): 61-4.
- Kim, Y. S., M. J. Morgan, et al. (2007). "TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the

- induction of necrotic cell death." Mol Cell **26**(5): 675-87.
- Kitada, S., M. Leone, et al. (2003). "Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins." J Med Chem **46**(20): 4259-64.
- Klebs, E. (1889). "Die Allgemeine Pathologie. Zweiter Theil. Storungen des Baues und der Zusammensetzung." Jena, Verlag Gustav Fischer.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzl, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-6.
- Knight, C. G. (1980). "Human cathepsin B. Application of the substrate N-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide to a study of the inhibition by leupeptin." Biochem J **189**(3): 447-53.
- Ko, F. N., I. S. Chen, et al. (1990). "Antiplatelet effects of chelerythrine chloride isolated from *Zanthoxylum simulans*." Biochim Biophys Acta **1052**(3): 360-5.
- Koenig, U., L. Eckhart, et al. (2001). "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1150-4.
- Koh, D. W., T. M. Dawson, et al. (2005). "Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1." Pharmacol Res **52**(1): 5-14.
- Koh, J. Y., M. B. Wie, et al. (1995). "Staurosporine-induced neuronal apoptosis." Exp Neurol **135**(2): 153-9.
- Korn, C., S. R. Scholz, et al. (2005). "Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state." J Biol Chem **280**(7): 6005-15.
- Kostura, M. J., M. J. Tocci, et al. (1989). "Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5227-31.
- Kreuder, V., J. Dieckhoff, et al. (1984). "Isolation, characterisation and crystallization of deoxyribonuclease I from bovine and rat parotid gland and its interaction with rabbit skeletal muscle actin." Eur J Biochem **139**(2): 389-400.
- Krieser, R. J., K. S. MacLea, et al. (2002). "Deoxyribonuclease IIalpha is required during the phagocytic phase of apoptosis and its loss causes perinatal lethality." Cell Death Differ **9**(9): 956-62.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12** Suppl 2: 1463-7.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Krstic, R. and T. Pexieder (1973). "Ultrastructure of cell death in bulbar cushions of chick embryo heart." Z Anat Entwicklungsgesch **140**(3): 337-50.
- Kumar, A. and U. Bora (2012). "Interactions of curcumin and its derivatives with nucleic acids and their implications." Mini Rev Med Chem **13**(2): 256-64.
- Kuramochi, H., H. Nakata, et al. (1979). "Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin." J Biochem **86**(5): 1403-10.
- Labbe, K. and M. Saleh (2008). "Cell death in the host response to infection." Cell Death Differ **15**(9): 1339-49.
- Lahm, A. and D. Suck (1991). "DNase I-induced DNA conformation. 2 A structure of a DNase I-octamer complex." J Mol Biol **222**(3): 645-67.

- Lamkanfi, M. "Emerging inflammasome effector mechanisms." Nat Rev Immunol **11**(3): 213-20.
- Lamkanfi, M. (2011). "Emerging inflammasome effector mechanisms." Nat Rev Immunol **11**(3): 213-20.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-7.
- Lavrik, I. N., A. Golks, et al. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-72.
- Lecoeur, H. (2002). "Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases." Exp Cell Res **277**(1): 1-14.
- Lechardeur, D., S. Dougaparsad, et al. (2005). "Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells." J Biol Chem **280**(48): 40216-25.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-98.
- Lenfeld, J., M. Kroutil, et al. (1981). "Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*." Planta Med **43**(2): 161-5.
- Lerman, L. S. (1961). "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines." J Mol Biol **3**: 18-30.
- Lessene, G., P. E. Czabotar, et al. (2013). "Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor." Nat Chem Biol **9**(6): 390-7.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-92.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Li, X., J. Gong, et al. (1994). "Apoptotic cell death during treatment of leukemias." Leuk Lymphoma **13 Suppl 1**: 65-70.
- Liang, L., M. Zhao, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family." Biochem J **370**(Pt 1): 195-203.
- Liddell, H. and R. Scott (1968). "Greek-English Lexicon." Oxford, The Clarendon Press.
- Liu, L. F., S. D. Desai, et al. (2000). "Mechanism of action of camptothecin." Ann N Y Acad Sci **922**: 1-10.
- Liu, Q., Y. Liu, et al. (2006). "A simple and sensitive method of nonaqueous capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for the analysis of chelerythrine and sanguinarine in Chinese herbal medicines." Talanta **70**(1): 202-7.
- Liu, Q. L., H. Kishi, et al. (2003). "Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells." Blood **102**(5): 1788-96.
- Liu, X., P. Li, et al. (1998). "The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8461-6.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**(2): 175-84.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1999). "Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1." J Biol Chem **274**(20): 13836-40.
- Liu, Y., G. Fiskum, et al. (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." J Neurochem **80**(5): 780-7.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed cell death. IV. The

- influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths." *J Insect Physiol* **11**(6): 803-9.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2002). "Caspase-independent cell deaths." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 727-33.
- Lopez-Hernandez, F. J., M. A. Ortiz, et al. (2003). "Z-FA-fmk inhibits effector caspases but not initiator caspases 8 and 10, and demonstrates that novel anticancer retinoid-related molecules induce apoptosis via the intrinsic pathway." *Mol Cancer Ther* **2**(3): 255-63.
- Los, M., M. Mozoluk, et al. (2002). "Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling." *Mol Biol Cell* **13**(3): 978-88.
- Lu, C., F. Zhu, et al. (2006). "Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3." *Mol Cell* **23**(1): 121-32.
- Lugovskoy, A. A., P. Zhou, et al. (1999). "Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis." *Cell* **99**(7): 747-55.
- Lum, J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cell* **120**(2): 237-48.
- Luthi, A. U. and S. J. Martin (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* **14**(4): 641-50.
- Llambi, F., F. Caseret, et al. (2001). "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC." *EMBO J* **20**(11): 2715-22.
- Mace, P. D., K. Linke, et al. (2008). "Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment." *J Biol Chem* **283**(46): 31633-40.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* **146**(1): 3-15.
- Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004). "Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology." *Cell Mol Life Sci* **61**(12): 1439-54.
- Markwardt, F., J. Drawert, et al. (1974). "Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein." *Biochem Pharmacol* **23**(16): 2247-56.
- Martin, L. J., N. A. Al-Abdulla, et al. (1998). "Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis." *Brain Res Bull* **46**(4): 281-309.
- Martinez, R. and L. Chacon-Garcia (2005). "The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work." *Curr Med Chem* **12**(2): 127-51.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." *Cell Death Differ* **14**(1): 10-22.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." *J Exp Med* **187**(8): 1261-71.
- Marzo, I. and J. Naval (2008). "Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy." *Biochem Pharmacol* **76**(8): 939-46.
- Mastrangelo, E., F. Cossu, et al. (2008). "Targeting the X-linked inhibitor of apoptosis protein through 4-substituted azabicyclo[5.3.0]alkane smac mimetics. Structure, activity, and recognition principles." *J Mol Biol* **384**(3): 673-89.
- Masuoka, J., T. Shiraishi, et al. (2001). "Expression of ICAD-I and ICAD-S in human brain tumor and its cleavage upon activation of apoptosis by anti-Fas antibody." *Jpn J Cancer Res* **92**(7): 806-12.
- McCarty, J. S., S. Y. Toh, et al. (1999). "Multiple domains of DFF45 bind synergistically to DFF40: roles of caspase cleavage and sequestration

- of activator domain of DFF40." Biochem Biophys Res Commun **264**(1): 181-5.
- McCarty, J. S., S. Y. Toh, et al. (1999). "Study of DFF45 in its role of chaperone and inhibitor: two independent inhibitory domains of DFF40 nuclease activity." Biochem Biophys Res Commun **264**(1): 176-80.
- McConnell, R. M., J. L. York, et al. (1993). "Inhibition studies of some serine and thiol proteinases by new leupeptin analogues." J Med Chem **36**(8): 1084-9.
- McGrath, M. E., A. E. Eakin, et al. (1995). "The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease." J Mol Biol **247**(2): 251-9.
- Meier, P., A. Finch, et al. (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.
- Meiss, G., S. R. Scholz, et al. (2001). "Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD." Nucleic Acids Res **29**(19): 3901-9.
- Mesner, P. W., Jr., Budihardjo, H., et al. (1997). "Chemotherapy-induced apoptosis." Adv Pharmacol **41**: 461-99.
- Meurette, O., A. Rebillard, et al. (2007). "TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions." Cancer Res **67**(1): 218-26.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Milanesi, E., P. Costantini, et al. (2006). "The mitochondrial effects of small organic ligands of BCL-2: sensitization of BCL-2-overexpressing cells to apoptosis by a pyrimidine-2,4,6-trione derivative." J Biol Chem **281**(15): 10066-72.
- Mille, F., C. Thibert, et al. (2009). "The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex." Nat Cell Biol **11**(6): 739-46.
- Mills, J. C., N. L. Stone, et al. (1999). "Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase." J Cell Biol **146**(4): 703-8.
- Mohammad, R. M., A. S. Goustin, et al. (2007). "Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1." Clin Cancer Res **13**(7): 2226-35.
- Moldeus, P., I. A. Cotgreave, et al. (1986). "Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine." Respiration **50** Suppl 1: 31-42.
- Moldoveanu, T., R. L. Campbell, et al. (2004). "Crystal structures of calpain-E64 and -leupeptin inhibitor complexes reveal mobile loops gating the active site." J Mol Biol **343**(5): 1313-26.
- Morgan, M. J., Y. S. Kim, et al. (2008). "TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death." Cell Res **18**(3): 343-9.
- Moubarak, R. S., V. J. Yuste, et al. (2007). "Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis." Mol Cell Biol **27**(13): 4844-62.
- Moxey, P. C. and J. S. Trier (1978). "Specialized cell types in the human fetal small intestine." Anat Rec **191**(3): 269-85.
- Mukae, N., M. Enari, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9123-8.
- Mukae, N., H. Yokoyama, et al. (2002). "Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation." Genes Dev **16**(20): 2662-71.
- Murachi, T. and K. Kato (1967). "Inhibition of stem bromelain by the chloromethyl ketone derivatives of N-tosyl-L-phenylalanine and N-tosyl-L-lysine." J Biochem **62**(5): 627-9.

- Nagase, H., H. Fukuyama, et al. (2003). "Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation." Cell Death Differ **10**(1): 142-3.
- Nagata, T., H. Kishi, et al. (2002). "The regulation of DNase activities in subcellular compartments of activated thymocytes." Immunology **105**(4): 399-406.
- Neimanis, S., W. Albig, et al. (2007). "Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport." J Biol Chem **282**(49): 35821-30.
- Nguyen, M., R. C. Marcellus, et al. (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): 19512-7.
- Nicotera, P., M. Leist, et al. (1999). "Apoptosis and necrosis: different execution of the same death." Biochem Soc Symp **66**: 69-73.
- Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." Oncogene **23**(16): 2757-65.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-42.
- Niquet, J., D. W. Seo, et al. (2006). "Hypoxia in presence of blockers of excitotoxicity induces a caspase-dependent neuronal necrosis." Neuroscience **141**(1): 77-86.
- Novo, E. and M. Parola (2008). "Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis." Fibrogenesis Tissue Repair **1**(1): 5.
- Nowakowska, E. and J. Godlewski (1979). "Role of serotonergic and adrenergic mechanisms in the action of prominal." Acta Physiol Pol **30**(5-6): 581-7.
- Oberhammer, F., J. W. Wilson, et al. (1993). "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." EMBO J **12**(9): 3679-84.
- Ohyama, T., Y. Li, et al. (1999). "A dual topoisomerase inhibitor, TAS-103, induces apoptosis in human cancer cells." Jpn J Cancer Res **90**(6): 691-8.
- Okamoto, M., N. Okamoto, et al. (2005). "Involvement of DNase gamma in the resected double-strand DNA breaks in immunoglobulin genes." Biochem Biophys Res Commun **327**(1): 76-83.
- Okazaki, M., Y. Ishibashi, et al. (1998). "Overexpressed mitochondrial hinge protein, a cytochrome c-binding protein, accelerates apoptosis by enhancing the release of cytochrome c from mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 131-6.
- Oltersdorf, T., S. W. Elmore, et al. (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." Nature **435**(7042): 677-81.
- Omura, S., Y. Iwai, et al. (1977). "A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization." J Antibiot (Tokyo) **30**(4): 275-82.
- Orrenius, S. (2007). "Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death." Drug Metab Rev **39**(2-3): 443-55.
- Orrenius, S., P. Nicotera, et al. "Cell death mechanisms and their implications in toxicology." Toxicol Sci **119**(1): 3-19.
- Orrenius, S., P. Nicotera, et al. (2010). "Cell death mechanisms and their implications in toxicology." Toxicol Sci **119**(1): 3-19.
- Orth, K., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A." J Biol Chem **271**(28): 16443-6.
- Overholtzer, M., A. A. Mailloux, et al. (2007). "A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion." Cell **131**(5): 966-79.
- Park, H. J., J. C. Lyons, et al. (1999). "Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity." Br J Cancer **80**(12): 1892-7.
- Patra, D. and C. Barakat (2011). "Synchronous fluorescence spectroscopic study of

- solvatochromic curcumin dye." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **79**(5): 1034-41.
- Patterson, S. D., C. S. Spahr, et al. (2000). "Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition." Cell Death Differ **7**(2): 137-44.
- Pautou, M. P. and M. Kieny (1971). "[Effect of Janus green on interdigital morphogenetic necrosis in the chicken: histological and cytological analysis]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **272**(18): 2378-81.
- Peitsch, M. C., H. G. Mannherz, et al. (1994). "The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?" Trends Cell Biol **4**(2): 37-41.
- Peluso, J. J., C. England-Charlesworth, et al. (1980). "Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia." Cell Tissue Res **211**(1): 105-15.
- 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): 873-7.
- Pham, C. G., C. Bubici, et al. (2007). "Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs." Mol Cell Biol **27**(11): 3920-35.
- Piippo, M., N. Lietzen, et al. (2010). "Pripper: prediction of caspase cleavage sites from whole proteomes." BMC Bioinformatics **11**: 320.
- Pistritto, G., M. Jost, et al. (2002). "Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia." Cell Death Differ **9**(9): 995-1006.
- Polyak, K., Y. Xia, et al. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-5.
- Pop, C., P. Fitzgerald, et al. (2007). "Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization." Biochemistry **46**(14): 4398-407.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-81.
- Potempa, J., A. Dubin, et al. (1988). "An elastase inhibitor from equine leukocyte cytosol belongs to the serpin superfamily. Further characterization and amino acid sequence of the reactive center." J Biol Chem **263**(15): 7364-9.
- Prasad, R., Atul, et al. (2013). "Blocking Plasmodium falciparum development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132." PLoS One **8**(9): e73530.
- Radakovic-Fijan, S., K. Rappersberger, et al. (1999). "Ultrastructural changes in PAM cells after photodynamic treatment with delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins or photosan." J Invest Dermatol **112**(3): 264-70.
- Rano, T. A., T. Timkey, et al. (1997). "A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE)." Chem Biol **4**(2): 149-55.
- Rao, L., D. Perez, et al. (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1441-55.
- Rathmell, J. C. and C. B. Thompson (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." Cell **109 Suppl**: S97-107.
- Recklinghausen, F. v. (1910). "Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie." Jena, Verlag Gustav Fischer.
- Reginato, M. J., K. R. Mills, et al. (2003). "Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis." Nat Cell Biol **5**(8): 733-40.
- Reh, S., C. Korn, et al. (2005). "Structural basis for stable DNA complex formation by the caspase-activated DNase." J Biol Chem **280**(50): 41707-15.
- Ricci, J. E., C. Munoz-Pinedo, et al. (2004). "Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75



- subunit of complex I of the electron transport chain." *Cell* **117**(6): 773-86.
- Riedl, S. J., M. Renatus, et al. (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): 405-13.
- Riou, J. F., P. Fosse, et al. (1993). "Intoplicine (RP 60475) and its derivatives, a new class of antitumor agents inhibiting both topoisomerase I and II activities." *Cancer Res* **53**(24): 5987-93.
- Rosado, J. A., J. J. Lopez, et al. (2006). "Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function." *J Cell Physiol* **209**(1): 142-52.
- Rotonda, J., D. W. Nicholson, et al. (1996). "The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis." *Nat Struct Biol* **3**(7): 619-25.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, et al. (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells." *EMBO Rep* **5**(8): 825-30.
- Rozman-Pungercar, J., N. Kopitar-Jerala, et al. (2003). "Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity." *Cell Death Differ* **10**(8): 881-8.
- Sabol, S. L., R. Li, et al. (1998). "Inhibition of apoptosis-associated DNA fragmentation activity in nonapoptotic cells: the role of DNA fragmentation factor-45 (DFF45/ICAD)." *Biochem Biophys Res Commun* **253**(1): 151-8.
- Sadowska, A. M. (2012). "N-Acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease." *Ther Adv Respir Dis* **6**(3): 127-35.
- Saeki, K., A. Yuo, et al. (2000). "Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells." *Cell Death Differ* **7**(12): 1263-9.
- Saito, Y., K. Nishio, et al. (2006). "Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide." *Free Radic Res* **40**(6): 619-30.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." *Nature* **391**(6662): 96-9.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1999). "Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S." *J Biol Chem* **274**(22): 15740-4.
- Sakahira, H., A. Iwamatsu, et al. (2000). "Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase." *J Biol Chem* **275**(11): 8091-6.
- Sakahira, H. and S. Nagata (2002). "Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase." *J Biol Chem* **277**(5): 3364-70.
- Sakahira, H., Y. Takemura, et al. (2001). "Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD." *Arch Biochem Biophys* **388**(1): 91-9.
- Salmon, E. D., M. McKeel, et al. (1984). "Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine." *J Cell Biol* **99**(3): 1066-75.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-7.
- Salzgeber, B. and R. Weber (1966). "[The regression of the mesonephros in the chick embryo. A study of acid phosphatase and cathepsin activity. Biochemical, histochemical, and electron microscopic observations]." *J Embryol Exp Morphol* **15**(3): 397-419.
- Samejima, K. and W. C. Earnshaw (1998). "ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear." *Exp Cell Res* **243**(2): 453-9.
- Samejima, K. and W. C. Earnshaw (2000). "Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal

- of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing." Exp Cell Res **255**(2): 314-20.
- Samejima, K. and W. C. Earnshaw (2005). "Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 677-88.
- Samson, F., J. A. Donoso, et al. (1979). "Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport." J Pharmacol Exp Ther **208**(3): 411-7.
- Sancho-Martinez, S. M., F. J. Piedrafita, et al. "Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis." Toxicol Sci **122**(1): 73-85.
- Sancho-Martinez, S. M., F. J. Piedrafita, et al. (2011). "Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis." Toxicol Sci **122**(1): 73-85.
- Sasaki, T., M. Kishi, et al. (1990). "Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins." J Enzyme Inhib **3**(3): 195-201.
- Saunders, J. W., Jr. (1966). "Death in embryonic systems." Science **154**(3749): 604-12.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." EMBO J **17**(6): 1675-87.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." J Biol Chem **274**(3): 1541-8.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-212.
- Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez, et al. (2008). "Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity." Genes Dev **22**(16): 2256-66.
- Schimmer, A. D. (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice." Cancer Res **64**(20): 7183-90.
- Schoellmann, G. and E. Shaw (1963). "Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin." Biochemistry **2**: 252-5.
- Scholz, S. R., C. Korn, et al. (2002). "The effect of ICAD-S on the formation and intracellular distribution of a nucleolytically active caspase-activated DNase." Nucleic Acids Res **30**(14): 3045-51.
- Schotte, P., W. Declercq, et al. (1999). "Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases." FEBS Lett **442**(1): 117-21.
- Schultz, R. M., P. Varma-Nelson, et al. (1989). "Active and inactive forms of the transition-state analog protease inhibitor leupeptin: explanation of the observed slow binding of leupeptin to cathepsin B and papain." J Biol Chem **264**(3): 1497-507.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-66.
- Sedic, M., M. Poznic, et al. (2008). "Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2- $\alpha$ ]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status." Mol Cancer Ther **7**(7): 2121-32.
- Shi, Y. (2001). "A structural view of mitochondria-mediated apoptosis." Nat Struct Biol **8**(5): 394-401.
- Shiokawa, D., T. Kobayashi, et al. (2002). "Involvement of DNase gamma in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells." J Biol Chem **277**(34): 31031-7.
- Shiokawa, D., H. Ohyama, et al. (1997). "Purification and properties of DNase gamma from apoptotic rat thymocytes." Biochem J **326** ( Pt 3): 675-81.
- Shiokawa, D., Y. Shika, et al. (2003). "Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity." Biochem J **376**(Pt 2): 377-81.
- Shiokawa, D. and S. Tanuma (1998). "Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase gamma." Biochem J **332** ( Pt 3): 713-20.

- Shiokawa, D. and S. Tanuma (2001). "Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis." Biochemistry **40**(1): 143-52.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, et al. (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." Mol Cell **11**(2): 519-27.
- Sidiropoulos, P. I., G. Goulielmos, et al. (2008). "Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts." Ann Rheum Dis **67**(10): 1382-9.
- Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, et al. (2006). "Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells." Mol Cancer Ther **5**(4): 927-34.
- Skalka, M., J. Matyasova, et al. (1976). "Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments." FEBS Lett **72**(2): 271-4.
- Solov'yan, V. T., I. O. Andreev, et al. (1997). "The cleavage of nuclear DNA into high molecular weight DNA fragments occurs not only during apoptosis but also accompanies changes in functional activity of the nonapoptotic cells." Exp Cell Res **235**(1): 130-7.
- Song, J., H. Tan, et al. (2010). "CasCleave: towards more accurate prediction of caspase substrate cleavage sites." Bioinformatics **26**(6): 752-60.
- Souers, A. J., J. D. Levenson, et al. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." Nat Med **19**(2): 202-8.
- Srinivasula, S. M., S. Gupta, et al. (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." J Biol Chem **278**(34): 31469-72.
- Srivastava, P. and D. Panda (2007). "Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding." FEBS J **274**(18): 4788-801.
- Stennicke, H. R., M. Renatus, et al. (2000). "Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8." Biochem J **350 Pt 2**: 563-8.
- Stordal, B. and M. Davey (2007). "Understanding cisplatin resistance using cellular models." IUBMB Life **59**(11): 696-9.
- Stridh, H., M. Kimland, et al. (1998). "Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis." FEBS Lett **429**(3): 351-5.
- Stroh, C. and K. Schulze-Osthoff (1998). "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates." Cell Death Differ **5**(12): 997-1000.
- Sugimori, T., J. Cooley, et al. (1995). "Inhibitory properties of recombinant human monocyte/neutrophil elastase inhibitor." Am J Respir Cell Mol Biol **13**(3): 314-22.
- Sun, L., H. Wang, et al. (2012). "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase." Cell **148**(1-2): 213-27.
- Susin, S. A., E. Daugas, et al. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." J Exp Med **192**(4): 571-80.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Suzuki, K., Y. Azuma, et al. (1995). "Biphasic effect of staurosporine on thymocyte apoptosis." Biochem Mol Biol Int **35**(5): 1085-92.
- Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-54.
- Suzuki, Y., Y. Imai, et al. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-21.
- Szabo, G., Jr. (1995). "50-kb chromatin fragmentation in the absence of apoptosis." Exp Cell Res **221**(2): 320-5.
- Taberner, L., N. Verdager, et al. (1993). "Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer

- d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin." Biochemistry **32**(33): 8403-10.
- Tahir, S. K., X. Yang, et al. (2007). "Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737." Cancer Res **67**(3): 1176-83.
- Takahashi, M., T. Ozaki, et al. (2007). "DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells." Oncogene **26**(38): 5669-73.
- Tang, D. and V. J. Kidd (1998). "Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis." J Biol Chem **273**(44): 28549-52.
- 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, K., D. Micha, et al. (2006). "Recent advances in targeting regulators of apoptosis in cancer cells for therapeutic gain." Expert Opin Investig Drugs **15**(6): 669-90.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-41.
- Temkin, V., Q. Huang, et al. (2006). "Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis." Mol Cell Biol **26**(6): 2215-25.
- Testa, C. M., T. B. Sherer, et al. (2005). "Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures." Brain Res Mol Brain Res **134**(1): 109-18.
- Thompson, A. F. and L. A. Levin (2010). "Neuronal differentiation by analogs of staurosporine." Neurochem Int **56**(4): 554-60.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." Br Med Bull **53**(3): 478-90.
- Thornberry, N. A. (1998). "Caspases: key mediators of apoptosis." Chem Biol **5**(5): R97-103.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." Nature **356**(6372): 768-74.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Timmer, J. C. and G. S. Salvesen (2007). "Caspase substrates." Cell Death Differ **14**(1): 66-72.
- Toh, S. Y., X. Wang, et al. (1998). "Identification of the nuclear factor HMG2 as an activator for DFF nuclease activity." Biochem Biophys Res Commun **250**(3): 598-601.
- Tokunaga, F., S. Sakata, et al. (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." Nat Cell Biol **11**(2): 123-32.
- Torriglia, A., C. Negri, et al. (1999). "Differential involvement of DNases in HeLa cell apoptosis induced by etoposide and long term-culture." Cell Death Differ **6**(3): 234-44.
- Torriglia, A., P. Perani, et al. (1998). "L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor." Mol Cell Biol **18**(6): 3612-9.
- Traber, M. G. and J. F. Stevens (2011). "Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective." Free Radic Biol Med **51**(5): 1000-13.
- Troyano, A., P. Sancho, et al. (2003). "The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells." Cell Death Differ **10**(8): 889-98.
- Tse, C., A. R. Shoemaker, et al. (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." Cancer Res **68**(9): 3421-8.
- Tsubuki, S., Y. Saito, et al. (1996). "Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl

- aldehydes of di-leucine and tri-leucine." *J Biochem* **119**(3): 572-6.
- Twelves, C. J., C. Gardner, et al. (1999). "Phase I and pharmacokinetic study of DACA (XR5000): a novel inhibitor of topoisomerase I and II. CRC Phase I/II Committee." *Br J Cancer* **80**(11): 1786-91.
- Ueno, T., M. Yamada, et al. (2011). "N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress." *J Biomed Mater Res A* **99**(4): 523-31.
- Umezawa, H., T. Aoyagi, et al. (1970). "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes." *J Antibiot (Tokyo)* **23**(5): 259-62.
- Upton, J. W., W. J. Kaiser, et al. (2010). "Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis." *Cell Host Microbe* **7**(4): 302-13.
- Vahsen, N., C. Cande, et al. (2006). "Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA." *Oncogene* **25**(12): 1763-74.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H. and B. Zhivotovsky (2010). "The unpredictable caspase-2: what can it do?" *Trends Cell Biol* **20**(3): 150-9.
- Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, et al. (2008). "DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas." *Cell Death Differ* **15**(3): 555-66.
- Valle, V. G., M. M. Fagian, et al. (1993). "The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants." *Arch Biochem Biophys* **307**(1): 1-7.
- van Delft, M. F., A. H. Wei, et al. (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): 389-99.
- Van Dyke, M. W. and P. B. Dervan (1983). "Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid. Footprinting with (methidiumpropyl-EDTA)iron(II)." *Biochemistry* **22**(10): 2373-7.
- Van Dyke, M. W., R. P. Hertzberg, et al. (1982). "Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(18): 5470-4.
- Van Loo, G., H. Demol, et al. (2002). "A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid." *Cell Death Differ* **9**(3): 301-8.
- van Loo, G., P. Schotte, et al. (2001). "Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation." *Cell Death Differ* **8**(12): 1136-42.
- van Maanen, J. M., J. Retel, et al. (1988). "Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review." *J Natl Cancer Inst* **80**(19): 1526-33.
- Van Noorden, C. J., R. E. Smith, et al. (1988). "Cysteine proteinase activity in arthritic rat knee joints and the effects of a selective systemic inhibitor, Z-Phe-AlaCH<sub>2</sub>F." *J Rheumatol* **15**(10): 1525-35.
- Van Roy, N., A. Jauch, et al. (1997). "Comparative genomic hybridization analysis of human neuroblastomas: detection of distal 1p deletions and further molecular genetic characterization of neuroblastoma cell lines." *Cancer Genet Cytogenet* **97**(2): 135-42.
- Vande Walle, L., P. Van Damme, et al. (2007). "Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates." *J Proteome Res* **6**(3): 1006-15.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, et al. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 700-14.
- Vandenabeele, P., S. Grootjans, et al. (2012). "Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models." *Cell Death Differ* **20**(2): 185-7.

- Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, et al. (2008). "Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death." Curr Mol Med **8**(3): 207-20.
- Varfolomeev, E., T. Goncharov, et al. (2008). "c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **283**(36): 24295-9.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- Vayssiere, J. L., P. X. Petit, et al. (1994). "Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11752-6.
- Vercammen, D., R. Beyaert, et al. (1998). "Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor." J Exp Med **187**(9): 1477-85.
- Vercammen, D., G. Brouckaert, et al. (1998). "Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways." J Exp Med **188**(5): 919-30.
- Verhaegen, M., J. A. Bauer, et al. (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): 11348-59.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (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., J. Silke, et al. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." J Biol Chem **277**(1): 445-54.
- Vinitsky, A., C. Michaud, et al. (1992). "Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex." Biochemistry **31**(39): 9421-8.
- Virchow, R. (1858). "Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI-Atheromatous affection of arteries. 1858." Nutr Rev **47**(1): 23-5.
- Vogler, M., K. Weber, et al. (2009). "Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors." Cell Death Differ **16**(7): 1030-9.
- Vogt, C. (1842). "Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete (Alytes obstetricians)." Solothurn: Jent und Gassman pp 130.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Walensky, L. D., A. L. Kung, et al. (2004). "Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix." Science **305**(5689): 1466-70.
- Walker, P. R., J. Leblanc, et al. (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.
- Walker, P. R. and M. Sikorska (1997). "New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis." Biochem Cell Biol **75**(4): 287-99.
- Walsh, J. G., S. P. Cullen, et al. (2008). "Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12815-9.
- Wan, K. F., S. L. Chan, et al. (2008). "Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism." J Biol Chem **283**(13): 8423-33.
- Wang, C. C., S. C. Lu, et al. (1998). "Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression." J Biol Chem **273**(27): 17192-8.
- Wang, G., Z. Nikolovska-Coleska, et al. (2006). "Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins." J Med Chem **49**(21): 6139-42.

- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." Genes Dev **10**(22): 2859-69.
- Wang, Z., A. S. Azmi, et al. (2009). "TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, inhibits cell growth and induces apoptosis in pancreatic cancer: involvement of Notch-1 signaling pathway." Cancer Res **69**(7): 2757-65.
- Wang, Z., H. Jiang, et al. (2012). "The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways." Cell **148**(1-2): 228-43.
- Waterhouse, N. J., D. M. Finucane, et al. (1998). "Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis." Cell Death Differ **5**(12): 1051-61.
- Wei, Y., C. P. Scholes, et al. (1981). "Ubisemiquinone radicals from the cytochrome b-c1 complex of the mitochondrial electron transport chain--demonstration of QP-S radical formation." Biochem Biophys Res Commun **99**(4): 1411-9.
- Whitaker, J. R. and J. Perez-Villase nor (1968). "Chemical modification of papain. I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethyl-sulfonyl fluoride." Arch Biochem Biophys **124**(1): 70-8.
- Wictome, M., I. Henderson, et al. (1992). "Mechanism of inhibition of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin." Biochem J **283** ( Pt 2): 525-9.
- Widlak, P. and W. T. Garrard (2001). "Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD." Mol Cell Biochem **218**(1-2): 125-30.
- Widlak, P., J. Lanuszewska, et al. (2003). "Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis." J Biol Chem **278**(29): 26915-22.
- Widlak, P., P. Li, et al. (2000). "Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates." J Biol Chem **275**(11): 8226-32.
- Widlak, P., O. Palyvoda, et al. (2002). "Modeling apoptotic chromatin condensation in normal cell nuclei. Requirement for intranuclear mobility and actin involvement." J Biol Chem **277**(24): 21683-90.
- Wilson, K. P., J. A. Black, et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." Nature **370**(6487): 270-5.
- Wohrl, W. and G. Hacker (1999). "Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA-fragmenting factor." Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 552-8.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res **30**: 87.
- Woo, E. J., Y. G. Kim, et al. (2004). "Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway." Mol Cell **14**(4): 531-9.
- Wu, M. H., C. Y. Lam, et al. (1995). "Translocation of nucleophosmin from nucleoli to nucleoplasm requires ATP." Biochem J **305** ( Pt 3): 987-92.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." Nature **284**(5756): 555-6.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, et al. (1984). "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." J Pathol **142**(1): 67-77.
- Yamada, T., H. Ohyama, et al. (1981). "Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro." Radiat Res **85**(3): 544-53.
- Yan, B., H. Wang, et al. (2006). "Regulation of mammalian horizontal gene transfer by apoptotic DNA fragmentation." Br J Cancer **95**(12): 1696-700.
- Yan, B., H. Wang, et al. (2006). "A unique role of the DNA fragmentation factor in maintaining genomic stability."

- Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1504-9.
- Yan, B., H. Wang, et al. (2006). "Apoptotic DNA fragmentation factor maintains chromosome stability in a P53-independent manner." Oncogene **25**(39): 5370-6.
- Yang, D., S. S. van Boom, et al. (1995). "Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis." Biochemistry **34**(39): 12912-20.
- Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
- Yang, Q. H., R. Church-Hajduk, et al. (2003). "Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis." Genes Dev **17**(12): 1487-96.
- Yasuhara, S., Y. Zhu, et al. (2003). "Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis." J Histochem Cytochem **51**(7): 873-85.
- Yazdanpanah, B., K. Wiegmann, et al. (2009). "Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase." Nature **460**(7259): 1159-63.
- Ye, K. (2006). "PIKE GTPase-mediated nuclear signalings promote cell survival." Biochim Biophys Acta **1761**(5-6): 570-6.
- Yu, R., S. Mandlekar, et al. (2000). "Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C." J Biol Chem **275**(13): 9612-9.
- Yu, S. W., H. Wang, et al. (2002). "Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor." Science **297**(5579): 259-63.
- Yuan, J. and G. Kroemer "Alternative cell death mechanisms in development and beyond." Genes Dev **24**(23): 2592-602.
- Yuan, J. and G. Kroemer (2010). "Alternative cell death mechanisms in development and beyond." Genes Dev **24**(23): 2592-602.
- Yuste, V. J., J. R. Bayascas, et al. (2001). "The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase." J Biol Chem **276**(25): 22323-31.
- Yuste, V. J., I. Sanchez-Lopez, et al. (2005). "The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis." J Biol Chem **280**(42): 35670-83.
- Zamzami, N., C. Brenner, et al. (1998). "Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins." Oncogene **16**(17): 2265-82.
- Zeuner, A., A. Eramo, et al. (1999). "Caspase activation without death." Cell Death Differ **6**(11): 1075-80.
- Zhai, D., C. Jin, et al. (2006). "Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins." Cell Death Differ **13**(8): 1419-21.
- Zhang, D. W., J. Shao, et al. (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-6.
- Zhang, J., X. Liu, et al. (1998). "Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12480-5.
- Zhang, L. J., Y. Z. Hao, et al. (2008). "Inhibition of apoptosis facilitates necrosis induced by cisplatin in gastric cancer cells." Anticancer Drugs **19**(2): 159-66.
- Zhao, Y., Z. Lu, et al. (2001). "Effects of phosphocreatine on apoptosis in a cell-free system." J Biol Chem **276**(37): 34573-8.
- Zhivotovsky, B. D., N. B. Zvonareva, et al. (1981). "Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body x-



- irradiation." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **39**(4): 437-40.
- Zhou, H., J. Chen, et al. (2012). "Design of Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors with subnanomolar binding affinities based upon a new scaffold." J Med Chem **55**(10): 4664-82.
- Zhou, P., A. A. Lugovskoy, et al. (2001). "Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6051-5.
- Zhou, Z., V. Han, et al. (2012). "New components of the necroptotic pathway." Protein Cell **3**(11): 811-7.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.
- Zong, W. X., D. Ditsworth, et al. (2004). "Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death." Genes Dev **18**(11): 1272-82.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.



## X. ANNEXE: CONTRIBUCIONS CIENTÍFIQUES

---

### *Contribucions a congressos*

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *Refractoriness of CAD endonuclease to induce the canonical apoptotic phenotype during caspase-dependent cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma derived cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: X Jornades científiques del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Lloc de celebració: Universitat Autònoma de Barcelona

Data: 13/06/2013

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *Impairment of apoptotic hallmarks through early cellular events during a caspases-dependent cell death in SH-SY5Y human derived neuroblastoma cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Mechanisms of Cell Death: The Command to Die* de la International Cell Death Society (ICDS)

Lloc de celebració: Fuengirola (Málaga)

Data: 06-09/06/2013

---

Autors: Casanelles E, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Yuste VY, Comella JX.

Títol: *Bcl-X<sub>L</sub> controls Smac/DIABLO release from the mitochondria protecting human glioblastoma-derived cells to TRAIL-induced apoptosis*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Mechanisms of Cell Death: The Command to Die* de la International Cell Death Society (ICDS)

Lloc de celebració: Fuengirola (Málaga)

Data: 06-09/06/2013

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Martínez-Soler F, Casanelles E, Plans G, Bruna J, Tortosa A, Yuste VY.

Títol: *Low levels of CAD impair low molecular weight DNA degradation in glioblastoma cells after apoptotic stimuli*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Mechanisms of Cell Death: The Command to Die* de la *International Cell Death Society (ICDS)*

Lloc de celebració: Fuengirola (Málaga)

Data: 06-09/06/2013

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Casanelles E, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Yuste VY.

Títol: *Failure in DFF40/CAD activation during caspases-dependent cell death and the absence of apoptotic nuclear changes in SH-SY5Y human neuroblastoma derived cells*

Tipus de participació: Comunicació oral

Congrés: XI APOREUNIÓN de la Red Española de Apoptosis (APOred)

Lloc de celebració: Fuengirola (Málaga)

Data: 05-06/06/2013

---

Autors: Sánchez-Osuna M, Casanelles E, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Yuste VY.

Títol: *Low levels of DFF40/CAD impair oligonucleosomal DNA degradation in human glioblastoma multiforme cells*

Tipus de participació: Comunicació oral

Congrés: XI APOREUNIÓN de la Red Española de Apoptosis (APOred)

Lloc de celebració: Fuengirola (Málaga)

Data: 05-06/06/2013

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *Failure of caspase-dependent cell death to reach the classical apoptotic phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma derived cells*

Tipus de participació: Comunicació oral

Congrés: *Global questions on advanced biology* de la Societat Catalana de Biologia (SCB)

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 09-12/06/2012

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gabernet G, Gil-Guiñon E, **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *DFF40/CAD-mediated nuclear morphology does not require oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptotic cell death*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Global questions on advanced biology* de la Societat Catalana de Biologia (SCB)

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 09-12/06/2012

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *The resistance to apoptotic stimuli is a common trait in human glioblastoma multiforme-derived cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Global questions on advanced biology* de la Societat Catalana de Biologia (SCB)

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 09-12/06/2012

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *Caspase-dependent DNA damage failure to reach the classical apoptotic phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma derived cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *The DNA damage response in human disease (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 28-30/05/2012

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Casanelles E, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Double-stranded DNA breaks are not detected in SK-N-AS cells displaying type II nuclear morphology upon apoptotic stimuli*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *The DNA damage response in human disease (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 28-30/05/2012

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Yuste VY.

Títol: *Absence of double-strand DNA breaks in human glioblastoma-derived cell lines during apoptotic cell death*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *The DNA damage response in human disease (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 28-30/05/2012

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Gil-Guiñon E, Casanova I, Yuste VY.

Títol: *Lack of nuclear apoptotic hallmarks during caspase-dependent cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Signal Rewiring and Addiction in Cancer (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 19-21/09/2011

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Casanelles E, Comella JX, Yuste VY.

Títol: *The extent of caspase-induced DFF40/CADmediated DNA degradation determines distinct apoptotic cell fates and new cell death paradigms*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Signal Rewiring and Addiction in Cancer (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 19-21/09/2011

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Casanelles E, Casanova I, Yuste VJ.

Títol: *Inherent resistance of human glioblastoma cells to degrade DNA into oligonucleosomal fragments upon different apoptotic insults*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: *Signal Rewiring and Addiction in Cancer (Barcelona BioMed conferences)*

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 19-21/09/2011

---

Autors: Gil-Guiñon E, Casanova-Salas I, Teixidó L, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Jara M, Yuste VJ.

Títol: *Actinomycin D-mediated intracellular microRNA environment alteration and sensitization towards TRAIL-induced cell death in U87MG human-derived glioblastoma cells*

Tipus de participació: Comunicació oral

Congrés: XXXIV Congreso de la SEBBM

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 05-08/09/2011

---

Autors: **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Gil-Guiñon E, Yuste VJ.

Títol: *Lack of nuclear apoptotic hallmarks during caspase-dependent cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: XIX Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 07-08/06/2011

---

Autors: Gil-Guiñon E, Casanova I, Iglesias-Guimaraes V, Casanelles E, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Jara M, Yuste VJ.

Títol: *Expression profile of microRNAs during Actinomycin D-mediated sensitization towards TRAIL-induced cell death in U87MG glioblastoma cells*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: XIX Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 07-08/06/2011

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Casanelles E, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *DFF40/CAD status determines a new paradigm of caspase-dependent cell death in the absence of oligonucleosomal DNA fragmentation*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: XIX Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 07-08/06/2011

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Casanelles E, Casanova I, Yuste VJ.

Títol: *LN-18 human glioblastoma-derived cells display incomplete caspase-dependent cell death upon different apoptotic insults*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: XIX Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 07-08/06/2011

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guñon E, Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Casanelles E, Llecha N, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *SK-N-AS cells display caspase-dependent nuclear morphology without concomitant oligonucleosomal DNA fragmentation: independent biochemical apoptotic outcomes but relied on DFF40/CAD activation*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: 13th International TNF Conference

Lloc de celebració: Hyogo (Japan)

Data: 15-18/05/2011

---

Autors: Casanelles E, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guñon E, Marqués-Fernández F, **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Bcl-X<sub>L</sub>, y no Bcl-2, Bcl-w o Mcl-1, controla la apoptosis inducida por la activación de receptores de muerte*

Tipus de participació: Comunicació oral

Congrés: X APOREUNIÓN de la Red Española de Apoptosis (APOred)

Lloc de celebració: Cuenca

Data: 06-08/02/2011

---

Autors: Sánchez-Osuna M, Giner-Delgado C, **Garcia-Belinchón M**, Guardia-Pena I, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guñon E, Casanelles E, Urresti J, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *LN-18 glioblastoma-derived cell line does not present oligonucleosomal DNA degradation or nuclear fragmentation upon apoptotic stimuli*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: VIII Simposi de neurobiologia experimental

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 19-20/10/2010

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gabernet G, Gil-Guñon E, Montoliu-Gaya L, **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, Urresti J, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *SK-N-AS cells display caspase-dependent nuclear morphology without concomitant oligonucleosomal DNA fragmentation*



Tipus de participació: Pòster

Congrés: VIII Simposi de neurobiologia experimental

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 19-20/10/2010

---

Autors: Sánchez-Osuna M, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Gabernet G, Urresti J, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Absence of oligonucleosomal DNA degradation in human glioblastoma-derived cell lines during apoptotic cell death*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: VII Jornada científica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 10/02/2010

---

Autors: Urresti J, **Garcia-Belinchón M**, Iglesias-Guimaraes V, Gabernet G, Sánchez-Osuna, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Ausencia de degradación oligonucleosomal del ADN durante la apoptosis inducida en células derivadas de glioblastoma humano*

Tipus de participació: Pòster

Congrés: III Jornadas científicas del Institut de Neurociències

Lloc de celebració: Barcelona

Data: 09-10/12/2009

---

## ***Publicacions***

---

Autors: Vindrieux D, Gras B, **Garcia-Belinchón M**, Mourah S, Lebbe C, Augert A, Bernard D

Títol: *Platelet-derived growth factor B induces senescence and transformation in normal human fibroblasts.*

Revista: Aging; Volum: 5(7); Pàgines: 531-8

Data: 2013

---

Autors: Casanelles E, Gozzelino R, Marqués-Fernández F, Iglesias-Guimaraes V, **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Solé C, Moubarak RS, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *NF- $\kappa$ B activation fails to protect cells to TNF $\alpha$ -induced apoptosis in the absence of Bcl-xL, but not Mcl-1, Bcl-2 or Bcl-w.*

Revista: Biochimica et Biophysica Acta; Volum: 1833(5); Pàgines: 1085-95

Data: 2013

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, **Garcia-Belinchón M**, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit-/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks.*

Revista: The Journal of Biological Chemistry; Volum: 288(13); Pàgines: 9200-15

Data: 2013

---

Autors: Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, **Garcia-Belinchón M**, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, Comella JX, Yuste VJ.

Títol: *Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease.*

Revista: The Journal of Biological Chemistry; Volum: 287(10); Pàgines: 7766-79

Data: 2012

---



