

ALTRES RESULTATS: EL PROMOTOR D'XIAP

DETERMINACIÓ DE LA REGIÓ PROMOTORA D'XIAP.

1. OBJECTIUS DE L'ESTUDI.

1.1. Antecedents.

La proteïna XIAP (amb número d'accés al GeneBank U45880) és el membre més representatiu de la família de les IAPs, i el que té un major poder d'inhibició de les caspases. La proteïna XIAP consta de 3 dominis BIR i un domini de dits de zinc RING. Tot i la similitud de la seqüència dels dominis BIR d'XIAP, cada un d'ells mostra diferents afinitats, en termes d'unió i inhibició, per les caspases. S'ha vist que XIAP pot ser processada per caspases actives *in vitro* en cèl·lules estimulades amb Fas, generant-se dos fragments [BIR1-2] i [BIR3-RING], específics per la unió i inhibició de les caspases-3 i 7, i caspasa-9 respectivament (Deveraux et al., 1999). El domini RING d'XIAP posseeix activitat E3-ubiquitina lligasa i sembla ser responsable de la seva autodegradació via proteasoma, en resposta a certs estímuls apoptòtics. El domini RING d'XIAP també pot mediar la interacció amb el receptor-1A de la proteïna morfogenètica òssia (BMP), mentre que el domini BIR pot reclutar els complexos TAB1/TAK1 al receptor. La proteïna XIAP pot activar el factor NF- κ B a través de l'activació de TAK1 (Hofer et al., 2000).

El missatger d'*xiap* s'expressa a la majoria de teixits a nivells bastant constants, suggerint que la regulació de la síntesi de la proteïna ha d'ésser important. En la caracterització de l'estructura genòmica primària i funcional d'XIAP, s'ha descrit que l'expressió de la proteïna està controlada específicament a nivell traduccional per un element IRES (de *internal ribosome-entry-site*), que es troba a la regió 5'-no traduïda (5'-UTR, de *untranslated region*). La regió 5'-UTR d'XIAP és inusualment llarga, de 5,5 kb (*kilobases*) pel transcrit murí i de més de 1,6 kb per l'humà, tot i que aquesta regió del transcrit humà no està ben definida (Holcik et al.1999).

1.2. Objectius plantejats.

Ens vam plantejar la caracterització del promotor del gen *xiap* i l'estudi de la regulació transcripcional i traduccional d'aquest, ja que en el moment d'iniciar aquest treball no estaven caracteritzats. Per les limitacions que presenten les cèl·lules de LLC-B per la realització d'estudis moleculars, vàrem fer l'estudi a la línia cel·lular Jurkat que, com s'ha comentat anteriorment, presenta molts avantatges per la realització d'estudis moleculars de promotors, ja que és fàcil de transfectar i de manipular.

Objectius plantejats:

- Obtenció d'un clon genòmic que contingués la regió 5'-UTR d'XIAP i clonatge d'aquesta regió al plàsmid pGL2-Basic.
- Determinació de l'inici de transcripció del gen, principals caixes de control del promotor, principals factors de transcripció que modulen la seva expressió, i estudi de les vies de transducció del senyal que el controlen.

2. RESULTATS DE L'ESTUDI I DISCUSSIÓ.

2.1. Clonatge de la regió promotora d'XIAP al plàsmid pGL2-Basic.

El primer que es va fer, va ser aconseguir un clon genòmic que contingués la regió del cromosoma on es troba el gen *xiap* i la seva regió promotora. Mitjançant les genoteques disponibles en aquell moment, vam triar un clon genòmic, RPC11 ("dJ"315G1 de la col·lecció *The Sanger Centre*), que contenia una ampla regió del cromosoma X on es trobava el gen (Xq24-25) empaquetada en un PAC. Es van dissenyar dos *primers* de PCR per amplificar la regió de les 4 *kilobases* anteriors a l'inici de traducció descrit a la bibliografia, i en el que suposàvem que es trobaria l'inici de transcripció. Els primers dissenyats van ser:

primer-F: 5'-CG**GAGCTC**GTTGAATGATGGTTTTATCTAA-3', que porta la diana SacI.

primer-R: 5'-CG**AAGCTT**TCTTGAAAATAGGACTTGTCCA-3', que porta la diana HindIII.

A cada un dels *primers* se'ls hi va posar una seqüència per un enzim de restricció diferent, per poder fer un clonatge direccional al plàsmid pGL2-Basic (de Promega), que porta el gen *reporter* de la luciferasa. Es va obtenir per PCR el fragment desitjat de la zona 5'-UTR d'XIAP, que inclou la regió que va des de -3999 a -5 nucleòtids respecte el codó d'inici de traducció descrit a la bibliografia.

La regió amplificada es va clonar al plàsmid pGL2-Basic. La construcció obtinguda la vam anomenar [pX-4000], i va ser confirmada per seqüenciació (Figura-A1). Un cop obtinguda aquesta construcció de 4 *kilobases*, on la regió clonada queda davant del gen *reporter* de la luciferasa, es va comprovar que contingués el promotor del gen. Per abordar aquest objectiu, vam realitzar diferents assaigs de transfecció en cèl·lules Jurkat. La construcció [pX-4000] presentava una clara activitat luciferasa basal, mentre que la transfecció de les cèl·lules amb el vector buit, [pGL2-Basic], no presentava activitat basal (Figura-A2). D'aquestes dades vam deduir que en el fragment clonat es trobava present el promotor del gen *xiap*.

2.2. Anàlisi de la regió promotora d'XIAP (I).

2.2.1. Obtenció de diferents construccions de la regió 5'-UTR d'XIAP.

Amb l'objectiu de determinar la localització del promotor d'*xiap*, es van fer una sèrie de delecions progressives a partir de l'extrem 5' de la construcció original [pX-4000]. Es van obtenir 3 noves construccions, que porten els fragments de la regió 5'-UTR que van des del nucleòtid -2434 al -5, que anomenem [pX-2434]; des del -2067 al -5, [pX-2067]; i des del -735 al -5, [pX-735], sempre referits segons l'origen de traducció del gen (Figura-A1). També es va fer una delecio de l'extrem 3' de la regió 5'-UTR d'XIAP, on es va treure la zona que va des del nucleòtid -134 al -5, mantenint la resta de la construcció original, des del nucleòtid -3999 al -135, que anomenem [pX-4000-del134] (Figura-A1); en aquesta construcció es va eliminar la regió corresponent a l'element IRES descrit. Les diferents construccions van ser confirmades per seqüenciació. A la Figura-A1 es poden veure les diferents construccions obtingudes al llarg de tot l'estudi.

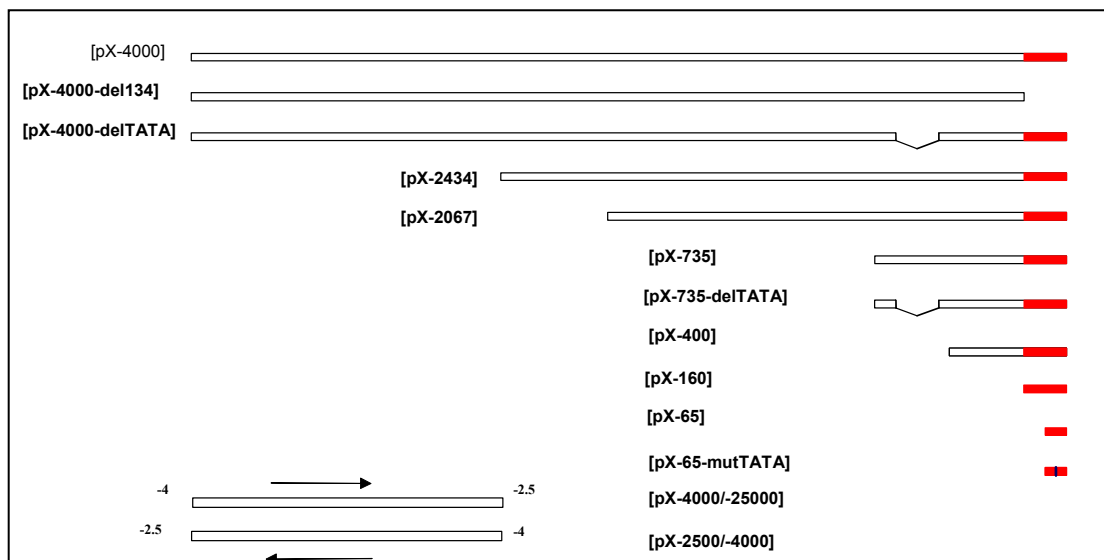


FIGURA-A1. Esquema de les diferents construccions obtingudes de la regió 5'-UTR d'XIAP. Segments de DNA que corresponen a les regions indicades de la zona 5'-UTR del gen *xiap* humà inserides en la regió de clonatge del plàsmid pGL2-Basic, que té com a *reporter* el gen de la luciferasa. La regió de 134 parells de bases en vermell indica la zona delecionada de la construcció [pX-4000-del134], que correspon a la zona on es troba descrit l'element IRES. Les altres construccions amb diferents delecions de la part 5' de la construcció gran original, [pX-4000], es van fer mitjançant digestió amb enzims de restricció i relligament de les construccions una vegada eliminats els fragments desitjats. Les construccions obtingudes són [pX-2434], [pX-2067], [pX-735], [pX-400], [pX-160] i [pX-65]. El número de cada una de les construccions indica en parells de bases la zona de 5'-UTR que contenen. També vam obtenir diferents construccions amb delecions de certs fragments de la regió 5'-UTR: [pX-4000-del134], [pX-4000-delTATA], [pX-735-delTATA], una construcció de la part més 5' de la regió d'estudi, [pX-4000/-25000], i una altre que porta la mateixa zona invertida, [pX-2500/-4000]. També es va realitzar una construcció que porta el fragment més petit, el dels 65 parells de bases més 3', on es va mutar una regió propera a la PPT descrita, [pX-65-mutTATA]. Totes les construccions, menys la [pX-4000-del134], [pX-4000/-25000] i [pX-2500/-4000], en la seva part 3' arriben fins a la posició -5 pb respecte l'inici de traducció descrit.

2.2.2. Efecte de diferents drogues sobre el promotor d'XIAP.

Una vegada obtingudes aquestes noves construccions de la regió 5'-UTR d'XIAP, es van transfectar cèl·lules Jurkat per estudiar l'efecte de diferents drogues. Es van transfectar les cèl·lules amb dues de les construccions del promotor d'XIAP, la més gran, [pX-4000], i la que té delecionada la part més pròxima a l'inici de traducció, [pX-4000-del134]. A les 24 hores d'haver fet la transfecció (temps necessari perquè s'expressi la luciferasa), les cèl·lules Jurkat van ser tractades amb TPA-100 nM, amb ionomicina-1 μ M (un ionòfor de calci), o la combinació de les dues drogues, a 6 hores de tractament. Com es pot veure a la Figura-A2, el tractament amb TPA feia incrementar molt l'activitat luciferasa de la construcció [pX-4000], mentre el tractament amb ionomicina pràcticament no feia augmentar l'activitat d'aquesta. El tractament combinat de les 2 drogues no tenia un efecte additiu. La construcció [pX-4000-del134] no presentava activitat luciferasa, ni basal ni induïda per cap de les dues drogues (Figura-A2). Les altres construccions, [pX-2434], [pX-2067] i [pX-735], presentaven el mateix comportament que la construcció [pX-4000] enfront a aquestes drogues.

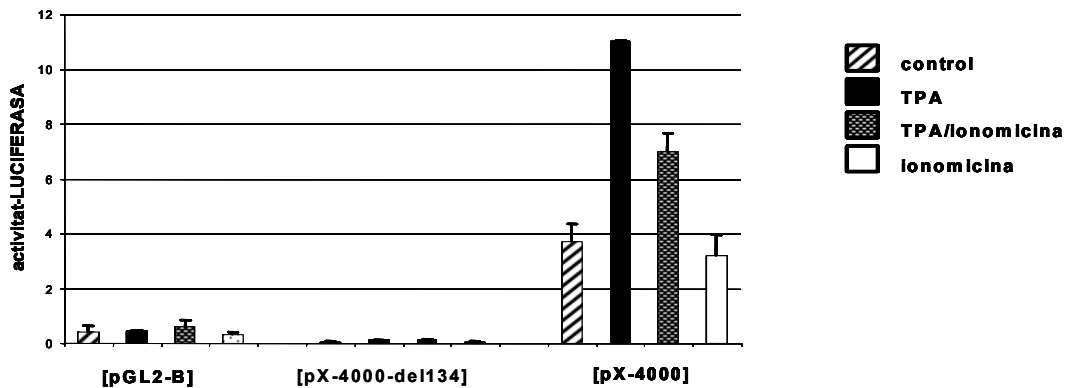


FIGURA-A2. Les cèl·lules Jurkat van ser transfectades amb 2 µg de plàsmid *reporter* amb GFP (pEGFP-C1) i amb 10 µg de les diferents construccions amb el gen *reporter* de la luciferasa: [pGL2-Basic] (com a control de l'activitat residual del plàsmid), [pX-4000-del134] i [pX-4000]. Després de 24 hores, les cèl·lules es van incubar amb TPA-100 nM, ionicina-1µM o la combinació de les dues drogues, durant 6 hores de tractament. El control eren cèl·lules transfectades que no van ser tractades. Al finalitzar el tractament les cèl·lules van ser recollides al mateix moment per la determinació de la viabilitat cel·lular i el percentatge de transfecció per citometria. Les cèl·lules van ser lisades per realitzar l'assaig luminomètric per avaluar l'activitat luciferasa. Els resultats presentats són la mitja de dues transfeccions independents.

2.2.3. Conclusions.

Dels resultats presentats en podem extreure algunes conclusions: (i) En la regió clonada hi ha present un promotor, ja que les construccions es transcriuen. (ii) La regió més pròxima a l'inici de traducció, des de -134 a -5 pb, on està descrit l'element IRES, és una regió necessària per la transcripció i/o traducció del gen.

2.2.4. Dades bibliogràfiques.

Mentre estàvem realitzant aquests experiments preliminars i analitzant els resultats, el grup del Dr. R. Korneluk va publicar diferents articles on s'anava caracteritzant l'element IRES de la regió 5'-UTR d'XIAP (Holcik et al., 1999). El gen xiap no es regula per una traducció "convencional" CAP-dependent, sinó que es traduiria de manera CAP-independent gràcies a l'element IRES, com ja s'ha comentat a l'apartat de Resultats i Discussió a l'estudi de la regulació d'Mcl-1 durant l'apoptosi a les cèl·lules Jurkat i en la Introducció de la Tesi. S'ha descrit que aquesta regió 5'-UTR forma estructures secundàries complexes i conté nombrosos inicis de traducció potencials anteriors a l'autèntic codó d'inici. Una regió 5'-UTR tan llarga és d'esperar que sigui un obstacle significatiu per una traducció eficient mitjançant un *scanning* ribosomal

convencional. Als treballs publicats per aquest grup s'utilitzaven construccions amb diferents deleccions o alteracions de la regió 5'-UTR del gen *xiap* humà. Es va determinar que la zona que retenia completament tota l'activitat IRES era el segment que va des del nucleòtid -162 al -1 respecte al codó d'inici de traducció. Quan la seqüència IRES es posava en sentit oposat o era mutada, l'expressió de la proteïna *reporter* es reduïa substancialment, indicant que la traducció d'XIAP podria ser completament dependent de la seqüència IRES. També es va descriure una seqüència PPT (de *polypyrimidine tract*) localitzada 34 nucleòtids abans del codó d'inici de traducció. La seqüència IRES d'XIAP era la primera IRES cel·lular descrita amb una PPT funcional (Holcik et al. 1999). L'element IRES d'XIAP possibilita una traducció eficient del gen sota condicions d'estrès fisiològic, i incrementa la protecció cel·lular enfront a l'apoptosi induïda per diferents estímuls. Van determinar l'existència d'un complex proteic, d'almenys 4 proteïnes citosòliques, que s'unien a la seqüència IRES. Els resultats de la bibliografia mostraven un paper important de la proteïna La (Holcik et al., 2000), possiblement facilitant el reclutament dels ribosomes, i de les ribonucleoproteïnes nuclears C1 i C2 (Holcik et al., 2003) en la regulació de la traducció d'XIAP. Es va descartar la interacció en aquesta regió de dues proteïnes d'unió als elements IRES, com PTB (de *polypyrimidine tract binding protein*) i PCBP (de *poly(C) binding protein*) (Holcik et al., 2000; 2003).

El mateix grup, mitjançant experiments amb construccions bicistròniques *promoterless* (sense promotor constitutiu), van descartar l'existència de possibles promotors críptics a la regió 5'-UTR d'XIAP (Holcik et al., 1999; 2003). Aquests resultats eren contradictoris amb les nostres dades, ja que nosaltres detectàvem activitat luciferasa en les construccions realitzades, atribuint-t'ho a l'existència de promotors en aquesta regió, tot i que no el teníem ni mapat ni caracteritzat.

2.3. Regulació traduccional d'XIAP.

2.3.1. Anàlisi de l'efecte de l'aspirina i l'estaurosporina en diferents promotors.

Al nostre laboratori estàvem estudiant l'efecte de diferents drogues proapoptòtiques, com aspirina i estaurosporina. Aquestes drogues provocaven la caiguda de l'activitat luciferasa a diferents construccions de promotors que disposàvem en el laboratori, bé per un bloqueig de l'activitat transcripcional o bé per un bloqueig en l'activitat traduccional. Durant el procés d'apoptosi, està descrit que té lloc una caiguda

generalitzada i inespecífica de l'activitat traduccional de la cèl·lula, afectant una gran quantitat de gens, i on pot tenir un paper important l'estat reductor de la cèl·lula. Els nostres resultats a l'estudi de la regulació d'Mcl-1 durant l'apoptosi induïda per aspirina en les cèl·lules Jurkat demostra clarament aquesta aturada de la síntesi proteica associada al procés d'apoptosi.

En aquests estudis vam analitzar l'activitat tant de promotors de gens implicats en el procés d'apoptosi, com són els promotors gran i petit de Bcl-2, de Bcl-X_L, o d' Mcl-1, com de promotors de gens que no estan implicats directament en el procés apoptòtic, com són el promotor constitutiu del CMV (*citomegalovirus*), de FAS (de *fatty acid sintetase*), implicat en la síntesi d'àcids grassos, o ACC (de *Acetyl-CoA carboxylase*), tots regulats de manera CAP-dependent. En tots ells havíem vist un clar descens de l'activitat luciferasa al induir apoptosi a les cèl·lules amb aspirina-10 mM durant 6 hores o amb estaurosporina-1 µM durant 3 hores, com ja s'ha presentat en l'apartat de Resultats de l'estudi de la regulació d'Mcl-1 durant l'apoptosi a cèl·lules Jurkat (Figura-7A). Aquest efecte era parcialment recuperat si abans de la incubació amb les drogues proapoptòtiques es preincubaven les cèl·lules amb l'inhibidor general de caspases Z-VAD.fmk, pel què aquests efectes eren parcialment dependents de l'activació de les caspases (dades del grup).

2.3.2. Anàlisi de l'efecte de l'aspirina i l'estaurosporina en les construccions d'XIAP.

Vàrem voler veure quin era l'efecte d'aquestes dues drogues en les construccions d'XIAP. Les cèl·lules Jurkat van ser transfectades amb diferents construccions, [pX-4000], [pX-2434] i [pX-2067]; després de 24 hores, les cèl·lules transfectades amb cada una de les construccions van ser sotmeses als tractaments amb TPA, aspirina o estaurosporina. Com ja s'ha comentat, el tractament amb TPA-100 nM feia incrementar l'activitat basal d'aquestes construccions (Figura-A3). Quan vam analitzar l'efecte del tractament amb aspirina-10 mM durant 6 hores, vam veure que a diferència dels altres promotors, no hi havia un descens de l'activitat luciferasa. Es més, durant el tractament amb aspirina es produïa un increment de l'activitat luciferasa. En canvi, el tractament amb estaurosporina-1 µM durant 3 hores produïa un descens de l'activitat luciferasa en les diferents construccions d'XIAP, igual al que observàvem en els altres promotors (Figura-A3). Per tant, sembla que hi ha un efecte diferencial de les dues drogues pel que fa a la construcció d'XIAP.

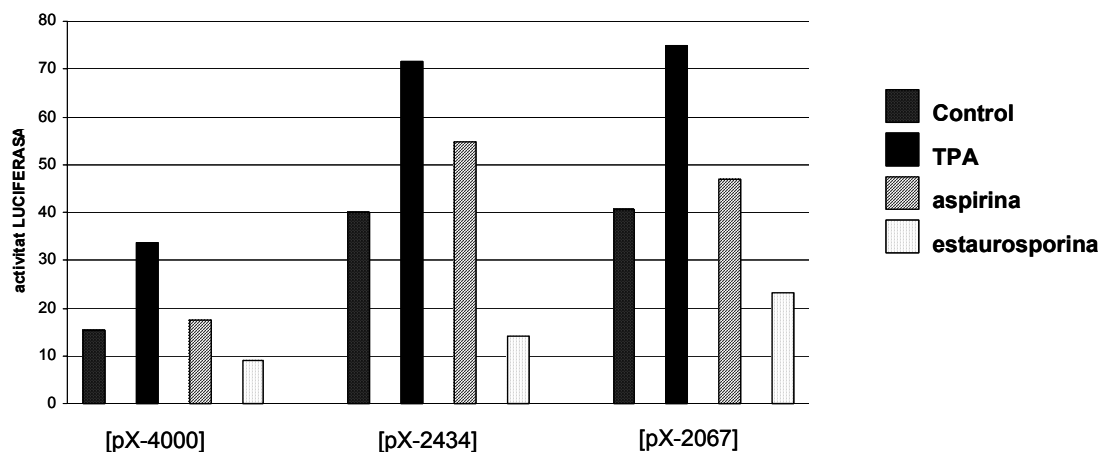


FIGURA-A3. Les cèl·lules Jurkat van ser transfectades amb 2 µg de plàsmid *reporter* amb GFP (pEGFP-C1) i amb 10 µg de diferents construccions d'XIAP: [pX-4000], [pX-2434] i [pX-2067]. Després de 24 hores, les cèl·lules es van sotmetre als diferents tractaments; TPA-100 nM durant 6 hores, aspirina-10 mM durant 6 hores i estaurosporina-1 µM durant 3 hores. Al finalitzar els tractaments, les cèl·lules van ser recollides al mateix temps per determinar la viabilitat cel·lular i el percentatge de transfecció per citometria. Les cèl·lules van ser lisades per realitzar l'assaig d'activitat luciferasa. Es mostra un experiment representatiu.

2.3.3. Discussió dels resultats.

Aquests resultats estan d'acord amb els treballs de la bibliografia on es descriu l'existència de la seqüència IRES que controla la regulació traduccional del gen (Holcik et al., 1999). En aquests treballs s'ha estudiat la regulació traduccional de diferents construccions durant l'apoptosi induïda per diferents estímuls (com pot ser la radiació ultraviolada, l'estrès cel·lular, la hipòxia o la infecció amb poliovirus). D'aquests estudis se'n conclou que la síntesi proteica dels gens regulats traduccionalment de manera CAP-dependent està afectada per l'entrada de les cèl·lules en apoptosi, mentre que no s'afectaria l'activitat traduccional dels gens regulats a aquest nivell per seqüències IRES, com és el cas d'XIAP (Holcik et al., 1999; 2000). Aquests resultats estan d'acord amb els que se'ns han reproduït al laboratori, ja que en totes les construccions CAP-dependents estudiades veiem un descens en l'activitat luciferasa a l'induir apoptosi, mentre que l'activitat de la construcció d'XIAP no cau a l'induir apoptosi amb aspirina. Tot i això, aquest efecte no es reproduïx quan induïm l'apoptosi amb estaurosporina, segurament degut a la inhibició transcripcional que produeix aquesta droga, que afectaria a tots els gens cel·lulars.

2.4. Anàlisi de la regió promotora d'XIAP (II).

2.4.1. Noves construccions de la regió 5'-UTR d'XIAP.

Es van fer noves construccions de la regió promotora d'XIAP, on es van anar delectant diferents fragments de la regió 5'-UTR a partir de l'extrem 5', per trobar una construcció on es perdés l'activitat transcripcional, i així acotar la regió on es trobaria el promotor i l'inici de transcripció. Es van obtenir construccions que porten els fragments que van des del nucleòtid -400 al -5, respecte l'inici de traducció descrit, [pX-400], del -160 al -5 [pX-160]; i del -65 al -5 [pX-65] (Figura-A1). Totes aquestes construccions presentaven una clara activitat luciferasa basal (Figura-A4), pel que consideràvem que hi havia un promotor, encara que no fos el promotor fisiològic d'XIAP. Cal dir que la construcció [pX-160] només té la regió descrita com a IRES, i la construcció [pX-65] conté només la meitat de la regió IRES descrita; tot i això seguien mantenint l'activitat luciferasa, indicant que es transcriuen i es tradueixen.

2.4.2. Delecció de les possibles seqüències crítiques de la regió 5'-UTR d'XIAP.

A la regió compresa entre l'element IRES descrit i -600 parells de bases hi ha múltiples seqüències ATG (cap descrita com origen de traducció, tot i que semblen estar en pauta) precedides d'una regió amb múltiples seqüències *consensus* TATA. Vam delectar aquesta regió de seqüències TATA en dues de les construccions, per veure sí s'afectava l'activitat luciferasa. Les construccions obtingudes [pX-4000-delTATA] i [pX-735-delTATA] (Figura-A1), corresponen a les construccions [pX-4000] i [pX-735] on s'ha delectat aquesta regió de caixes TATA. Estudis de transfecció amb aquestes construccions van demostrar que seguien mantenint activitat luciferasa, i fins i tot estava incrementada respecte les construccions senceres respectives (Figura-A4). Per tant, sembla que aquestes regions no són essencials per la regulació transcripcional i traduccional d'XIAP.

Es van fer dues noves construccions, una que portava la regió que va des de -4000 a -2500 parells de bases respecte l'ATG descrit, [pX-4000/-25000], i una que portava la mateixa regió però invertida, [pX-2500/-4000] (Figura-A1), pel que els hi faltaria la regió més propera a l'inici de traducció descrit i l'element IRES. Cap d'aquestes construccions mostrava activitat luciferasa significativa (Figura-A4).

2.4.3. Mutació d'una seqüència important per l'IRES.

A la zona on estava descrita la seqüència PPT, es van descriure regions reguladores importants per la unió de diferents factors necessaris per la funcionalitat de la seqüència IRES. Vam mutar una d'aquestes seqüències, concretament una possible seqüència TATA que precedeix la PPT (vam canviar 4 nucleòtids), que forma part de la seqüència central de regulació de l'activitat de l'IRES. La construcció obtinguda es va anomenar [pX-65-mutTATA] (Figura-A1), que és igual que la construcció [pX-65] però amb les mutacions esmentades. Aquesta construcció perdia tota l'activitat luciferasa (Figura-A4). D'aquests resultats deduïm que la regió mutada és essencial per la transcripció i/o traducció del gen, ja que la construcció sense la mutació, [pX-65], té una clara activitat luciferasa.

2.5. Abordatge del punt d'inici de transcripció d'XIAP.

Vam intentar determinar l'inici de transcripció del gen *xiap* mitjançant un abordatge groller i alhora senzill. Ens vam plantejar fer un Northern blot d'*xiap* utilitzant com a sondes d'hibridació diferents fragments solapats de la regió 5'-UTR d'XIAP, generats per digestió amb enzims de restricció o per PCR. Aquests fragments eren utilitzats com a sonda per hibridar diferents membranes d'RNA de cèl·lules Jurkat. A partir de la sonda on es perdés el senyal del missatger d'*xiap*, seria indicatiu del punt on s'acabava el transcrit endògen en les cèl·lules Jurkat, acotant així grollerament l'inici d'aquest. Utilitzant una sonda exònica d'*xiap* detectàvem bé el missatger d'*xiap*, que té una mida de 9 *kilobases*, com ha quedat demostrat en els resultats presentats a l'estudi de la regulació d'Mcl-1 durant l'apoptosi a les cèl·lules Jurkat, on a la Figura-7B es mostra un Northern blot d'*xiap*. Amb cap dels fragments generats de la regió 5'-UTR d'XIAP vam aconseguir detectar el missatger, ni tan sols amb el fragment més 3', que es trobava molt proper a l'inici del cDNA descrit (que es troba 33 nucleòtids abans de l'AUG).

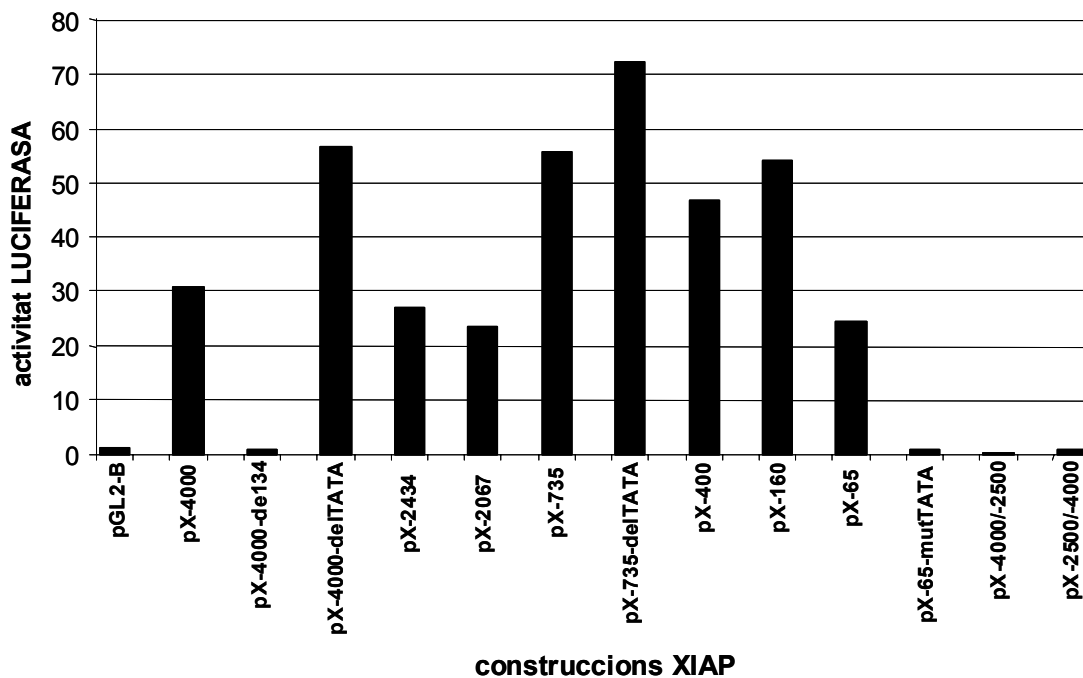


FIGURA-A4. Transfecció de les cèl·lules Jurkat amb totes les construccions obtingudes de la regió 5'-UTR d'XIAP. Les cèl·lules es van transfectar amb 2 µg de plàsmid [pEGFP] i 10 µg de [pGL2-Basic] o de cada una de les construccions d'XIAP: [pX-4000], [pX-4000-del134], [pX4000-delTATA], [pX-2434], [pX-2067], [pX-735], [pX-735-delTATA], [pX-400], [pX-160], [pX-65], [pX-65-mutTATA], [pX-4000/-2500] i [pX-2500/-4000]. Les cèl·lules van ser recollides al mateix temps per determinar la viabilitat cel·lular i el percentatge de transfecció per citometria. Es va analitzar l'activitat luciferasa com s'especifica en l'apartat de materials i mètodes. Es mostra un experiment representatiu.

3. DISCUSSIÓ GENERAL DELS RESULTATS.

Els resultats d'aquest estudi, tot i la gran quantitat de construccions fetes i la quantitat d'informació que n'hem obtingut, tenen una difícil interpretació, ja que no estan d'acord amb alguns dels resultats presents a la bibliografia. Sempre és difícil anar en contra de resultats publicats i acceptats per la majoria de la comunitat científica, ja que no tan sols has de validar els teus resultats, sinó que a més has d'invalidar els seus d'una manera contundent i sense espai pels dubtes.

HI HA UN PROMOTOR A LES NOSTRES CONSTRUCCIONS?

Potser és estrany començar una discussió amb una pregunta, però encara avui no sabem si a la regió analitzada hi ha un promotor funcional. Aquesta sens dubte és la part més discutible del nostre estudi, i on no hem sabut trobar una resposta ni als nostres resultats, ni a la bibliografia. A la construcció més gran que hem fet al laboratori, [pX-4000], s'inclou una ampla regió de la zona 5'-UTR del gen *xiap*, que engloba les 4 *kilobases* anteriors a l'inici de traducció descrit. Aquesta construcció presenta una clara activitat luciferasa, pel que suposem que conté el promotor del gen, que fins a la redacció d'aquesta Tesi encara no s'ha delimitat. Com s'ha comentat anteriorment, als treballs del grup del Dr. Korneluk, on es descriu principalment la seqüència IRES present a XIAP, es descarta la possibilitat que en la regió que va des de -1007 parells de bases fins al punt d'inici de traducció del gen (on hi ha l'AUG) hi hagi qualsevol activitat promotora.

En aquests treballs on es descriu l'estructura genòmica i el control traduccional de l'expressió d'XIAP per l'IRES, es preveu la formació d'estructures secundàries complexes en aquesta zona i es descriuen els potencials inicis de traducció que es troben més 5' de l'inici de traducció majoritari, que impossibilitarien un *scanning* ribosomal convencional (Holcik et al., 1999). La formació d'aquestes estructures secundàries complexes poden ser un obstacle per l'elongació de la cadena d'àcids nuclèics en la tècnica de la *primer extension*. Nosaltres vam intentar aquesta tècnica, per veure si podíem mapar l'inici de transcripció del gen, però no vam tenir èxit (tot i que suposem que el que ens va fallar va ser la tècnica). Aquests autors descriuen i caracteritzen la seqüència IRES d'XIAP mitjançant l'anàlisi de la regió de 1007 parells de bases anteriors a l'AUG d'inici, del transcrit murí i humà, en construccions bicistròniques. En aquestes construccions bicistròniques, al primer cistró es posa una regió 5'-UTR d'un gen CAP-dependent que traduirà el gen de la β -galactosidasa, i al segon cistró es posa la regió de 1007 parells de bases de la regió 5'-UTR d'XIAP, que traduirà el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), tot sota control d'un promotor constitutiu com és el del citomegalovirus (CMV). Quan s'indueix l'activitat del promotor CMV, es detecta activitat CAT, indicatiu que aquesta proteïna s'està traduint gràcies a l'activitat de l'IRES. Quan posen la regió 5'-UTR d'XIAP invertida o es realitzen mutacions de la seqüència PPT descrita, perden l'activitat CAT, indicatiu que la seqüència IRES no pot realitzar la seva funció essencial en la traducció. Aquests autors consideren que aquests experiments són irrefutables per demostrar l'activitat IRES a la regió 5'-UTR d'XIAP. El més interessant per nosaltres, són els resultats que

van obtenir quan van delectonar el promotor constitutiu del citomegalovirus d'aquestes construccions bicistròniques (construccions *promoterless*), o quan analitzaven construccions monocistròniques convencionals amb la regió 5'-UTR d'XIAP davant del gen *reporter* CAT (sense promotor CMV addicional). En aquestes construccions es perdia completament l'activitat CAT, fet que descartava la possibilitat que en aquesta regió hi hagués qualsevol promotor críptic funcional (Holcik et al., 1999; 2000; 2003). Si aquests resultats són certs, entren en clara contradicció amb els nostres resultats, on detectem una clara activitat luciferasa a la construcció [pX-65], suggerint l'existència d'un promotor en aquesta regió.

El fet que les construccions amb les que ells van fer els estudis estiguessin controlant l'expressió del gen CAT, i en canvi les nostres el gen de la luciferasa, ens va fer pensar si la dicotomia de resultats no seria conseqüència d'una diferent sensibilitat en la detecció de les activitats dels gens *reporters* utilitzats en els dos estudis, ja que el gen de la luciferasa és més sensible que el de la CAT. Per resoldre aquest punt, vam fer dues noves construccions de la regió 5'-UTR d'XIAP amb un plàsmid que porta el gen *reporter* CAT (pGCAT). Una portava el fragment que va des de -2000 a -5 parells de bases, [pX-2000/-5CAT], i l'altre el mateix tros invertit, [pX-5/-2000CAT]. No vam ser capaços de detectar activitat CAT en aquestes construccions, tot i que el problema novament podria haver estat en la tècnica.

Els mètodes per determinar l'activitat dels IRES basant-se en estudis amb construccions bicistròniques, tot i ser la tècnica més utilitzada, han estat àmpliament criticats per la inadequada detecció de missatgers aberrants que es formen a les cèl·lules transfectades utilitzant aquestes construccions. S'ha descrit que durant els assaigs de transfecció amb construccions bicistròniques de DNA que porten l'IRES d'XIAP, és generen missatgers aberrants generats per *splicing* del segon cistró. Aquests missatgers semblen contribuir a uns nivells inusualment alts d'activitat IRES aparent. Les cèl·lules transfectades directament amb les mateixes construccions però d'RNA, mostren una activitat IRES molt menor, semblants als baixos nivells detectats en la traducció *in vitro* de les construccions bicistròniques d'RNA en lisats de reticulòcits de conill (Eden et al., 2004). Per tant, amb els tests de les construccions bicistròniques, sembla difícil determinar si l'increment en l'activitat del gen *reporter* és degut a l'existència de seqüències IRES funcionals, o a la generació de trànscripats aberrants generats a la regió d'estudi per promotors críptics.

LA POSSIBLE EXISTÈNCIA D'UN PROMOTOR CRÍPTIC A L'ELEMENT IRES D'XIAP.

Els resultats presentats, evidencien la possibilitat que a la regió de la seqüència IRES d'XIAP hi puguin haver promotors críptics, capaços de generar trànscrips alternatius que poden ser eficientment traduïts per detectar activitat luciferasa. El fet que la construcció més petita presentada, [pX-65], presenti activitat luciferasa, fa col·locar aquests promotors alternatius a la regió més important de control de l'IRES, ja que en aquesta zona s'hi troba la caixa PPT. A més, quan vam alterar la seqüència adjacent a la caixa PPT, [pX-65-mutTATA], perdíem l'activitat luciferasa. Aquests resultats suggereixen que en aquesta regió es podrien generar aquests trànscrips alternatius mitjançant l'existència de promotors críptics funcionals. A la literatura hi ha un treball que podria explicar en part els nostres resultats. En aquest estudi s'analitza la seqüència IRES del gen eIF4G (Han i Zhang, 2002). Es realitzen assaigs de transfecció utilitzant construccions bicistròniques *promoterless* per testar la funcionalitat de l'IRES de la regió 5'-UTR del factor eIF4G. L'estudi va revelar l'existència d'un promotor críptic molt potent, l'activitat del qual radica en la integritat de la seqüència PPT, identificada també com un component essencial del putatiu IRES. La seqüència PPT es solapa amb el lloc d'unió del factor de transcripció C/EBP β , i també s'ha determinat la unió dels factors Sp1 i Ets en regions properes. Aquests factors de transcripció possibilitarien la generació d'un trànscrip alternatiu d'eIF4G a partir d'aquest promotor críptic de la regió 5'-UTR. En aquest estudi es descarta l'existència d'aquesta seqüència IRES com a tal. També es van trobar activitats promotores a les regions 5'-UTRs dels missatgers del gen humà Sno i del gen murí Bad, tot i que aquests trànscrips no podien ser detectats en experiments de Northern blot pels baixos nivells d'expressió (Han i Zhang, 2002). La regió 5'-UTR del virus de l'hepatitis-c (HCV) també conté un IRES. S'ha demostrat que la seqüència 5'-UTR de l'HCV és capaç de dirigir l'expressió dels gens *reporters* als quals precedeix, on s'ha demostrat per Northern blot i 5'-RACE l'existència de missatgers que comencen en aquesta zona, argumentant a favor de l'existència d'una seqüència promotora en aquesta regió 5'-UTR del virus (Dumas et al., 2003). Per tant, podria ser que en les nostres construccions es generessin trànscrips alternatius capaços de conferir la síntesi proteica necessària per generar una activitat luciferasa detectable. Vam idear diferents estratègies per la detecció d'aquests trànscrips alternatius, per tècniques de RT-PCR i de Northern blot per detectar el missatger de la luciferasa, però amb cap d'elles vam aconseguir detectar-los.

INTENTS DE DETERMINAR EL PUNT D'INICI DE TRANSCRIPCIÓ.

Tots els nostres intents per determinar l'origen de transcripció d'*xiap* han estat frustrats. Encara avui no es coneix quin és el punt d'inici de transcripció del gen. Si existissin aquests promotors críptics a la seqüència de l'IRES, aquests no podrien en cap cas correspondre als missatgers d'*xiap* endògens, que tenen una mida molt gran (de 9 kilobases), detectats a les cèl·lules Jurkat i a diferents models cel·lulars. L'estratègia que vam seguir per intentar acotar la regió 5'-UTR d'XIAP, mitjançant la hibridació del missatger per Northern blot utilitzant com a sondes diferents fragments de la regió 5'-UTR d'XIAP, no va donar els resultats esperats. Encara no sabem perquè les sondes més properes a l'inici de traducció descrit, com la sonda que incloïa la seqüència de l'IRES, no eren capaces de detectar el transcrit endògen d'*xiap*, i només vam ser capaços de fer-ho mitjançant una sonda exònica interna del gen. Una possible explicació d'això seria per la estructura secundària complexa que forma el missatger d'*xiap* en aquesta regió.

EXISTENCIA D'ELEMENTS IRES FUNCIONALS EN EUCARIOTES.

La resposta cel·lular a l'estrès comporta una ràpida inhibició de la síntesi proteica dels missatgers CAP-dependents per múltiples mecanismes, tot i que hi ha una activitat de síntesi proteica residual, que permet la traducció de proteïnes que tenen un paper clau en aquesta resposta a l'estrès. Un exemple d'això podria ser la proteïna Bcl-2, que té una regió 5'-UTR de 1,45 *Kilobases*, que inclou 10 AUGs, i on s'ha demostrat recentment que hi ha una seqüència IRES, que facilita la seva traducció en aquestes situacions d'estrès (Sherrill, et al., 2004). Tot i no estudiar si l'IRES descrit en XIAP és funcional, els nostres resultats semblen argumentar a favor de la seva existència. Els resultats obtinguts amb les diferents construccions d'XIAP durant el tractament amb aspirina, on no disminueix l'activitat luciferasa per l'entrada de les cèl·lules en apoptosi, i fins i tot augmenten els nivells d'activitat, estarien d'acord amb una regulació traduccional CAP-independent, regulada per aquest putatiu IRES. Tot i això, com s'ha comentat a l'estudi de la regulació d'Mcl-1 durant l'apoptosi a les cèl·lules Jurkat, sembla que alguns dels factors que són necessaris per la traducció CAP-dependent, com el factor eIF2 α , també són necessaris per la traducció CAP-independent. La fosforilació del factor eIF2 α que es dona durant el tractament amb aspirina, sembla necessària per l'activació dels IRES cel·lulars (Gerlitz et al., 2002). El fet que les

úniques construccions on no detectem activitat luciferasa siguin aquelles en les que s'ha eliminat o alterat la seqüència de l'IRES, com són [pX-4000-del134], [pX-65-mutTATA], [pX-4000/-2500] i [pX-2500/-4000], demostra la importància d'aquesta regió, ja sigui a nivell de regulació transcripcional o a nivell de regulació traduccional .

Tot i que la existència de les seqüències IRES està ben acceptada als missatgers dels picornavirus, sembla no ser tant clara la seva existència als missatgers eucariotes. El nombre de missatgers eucariotes regulats traduccionalment per IRES encara és petit, però cada cop va augmentant més degut a la identificació de nous IRES a diferents gens. Molts d'aquests elements IRES regulen la traducció de proteïnes que protegeixen a la cèl·lula de l'estrès, quant la maquinària traduccional està afectada. L'estructura, especificitat i regulació de l'activitat d'aquests IRES pot veure's afectada durant l'estrès nutricional, la diferenciació o la mitosi (Komar i Hatzoglou, 2005). Hi ha autors que neguen l'existència dels elements IRES en eucariotes, basant-se en la crítica de la metodologia de biologia molecular utilitzada per confirmar la seva existència (construccions bicistròniques), la pobre caracterització i anàlisi dels missatgers presents als experiments de transfecció, o la sensibilitat dels gens *reporters* utilitzats pel seu estudi (Kozak, 2001). En canvi, una gran quantitat d'investigadors argumenten a favor de l'existència dels IRES en gens eucariotes, basant-se principalment en l'ús d'aquestes construccions bicistròniques i en la disminució que es dona de l'activitat traduccional quan aquestes seqüències són alterades (Schneider et al., 2001). Nosaltres, aliens a les disputes sobre la existència o no de les seqüències IRES en eucariotes, argumentaríem a favor d'aquestes, tot i que amb precaució, ja que els nostres resultats i molts dels presents a la literatura podrien ser conseqüència de l'existència de promotors críptics en aquestes regions definides com a putatius IRES. És evident la necessitat d'estudiar amb més profunditat i rigor la maquinària de regulació transcripcional de la cèl·lula i els trànscrips generats per aquesta, així com també la maquinària de regulació traduccional, pel què fan falta noves tecnologies d'anàlisi.

MATERIALS I MÈTODES

I. CULTIUS CELLULARS

I.1. CULTIU I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES JURKAT

- I.1.1. Criopreservació de les cèl·lules Jurkat
- I.1.2. Descongelació de les cèl·lules Jurkat
- I.1.3. Manipulació de les cèl·lules Jurkat abans de fer els experiments

I.2. OBTENCIÓ, CULTIU I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES DE LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B

- I.2.1. Recollida de mostres
- I.2.2. Separació de cèl·lules mononucleades
- I.2.3. Criopreservació de les cèl·lules de LLC-B
- I.2.4. Descongelació de les cèl·lules de LLC-B
- I.2.5. Cultiu cel·lular de LLC-B

I.3. ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR PER CITOMETRIA DE FLUX

- I.3.1. Protocol per l'anàlisi de la viabilitat cel·lular per citometria de flux
- I.3.2. Protocol per a determinar l'apoptosi per citometria en condicions en què no es poden utilitzar fluorocroms

I.4. ANÀLISI DE POBLACIONS CEL·LULARS PER CITOMETRIA DE FLUX

II. PROTEÏNA

II.1. LISI CEL·LULAR I EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES

- II.1.1. LISI DESNATURALITZANT. EXTRACCIÓ TOTAL DE PROTEÏNES
- II.1.2. LISI NO DESNATURALITZANT
 - II.1.2.1. Extractes totals
 - II.1.2.2. Separació de citosol i de proteïnes associades a membranes. Extracció proteica fraccionada

II.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

II.3. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT

- II.3.1. Preparació de les mostres
- II.3.2. Electroforesi, transferència i incubació amb l'anticòs
- II.3.3. Deshibridació de membranes

II.4. ASSAIG D'INCORPORACIÓ DE LEUCINA TRITIADA PER QUANTIFICAR LA TAXA DE SÍNTESI DE PROTEÏNA

III. MISSATGER

III.1. OBTENCIÓ DE L'RNA MISSATGER TOTAL D'UNA MOSTRA

III.2. ANÀLISI DELS NIVELLS DE MISSATGER PER NORTHERN BLOT

III.3. OBTENCIÓ DE cDNA PER RT-PCR

III.4. ANÀLISI DELS NIVELLS DE MISSATGER PER PCR QUANTITATIVA

IV. DNA

IV.1. EXTRACCIÓ DEL DNA GENÒMIC

- IV.1.1. DNA genòmic de limfòcits
- IV.1.2. DNA genòmic de cèl·lules de l'epiteli bucal d'individus sans control

IV.2. AMPLIFICACIÓ DE LA ZONA ON HI HA LES INSERCIÓNS PER PCR

IV.3. SEQÜENCIACIÓ DE LES BANDES AMPLIFICADES PER PCR

V. TRANSFECCIÓ DE CÈL·LULES JURKAT

V.1. OBTENCIÓ DELS PLÀSMIDS

V.2. ASSAIG DE TRANSFECCIÓ

VI. APÈNDIX. PRINCIPALS REACTIUS I DROGUES UTILITZATS

I. CULTIUS CEL·LULARS.

I.1. CULTIU I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES JURKAT.

La línia cel·lular Jurkat, derivada d'una leucèmia aguda de cèl·lules T, prové de l'ECCC (*European Collection of Cell Cultures*). Les cèl·lules creixen en suspensió i es cultiven en medi RPMI 1640 complet (de Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementat amb 10 % de sèrum fetal boví (GIBCO-BRL, Paisley, UK) inactivat per calor (30 minuts a 56°C, per tal d'inhibir les proteïnes del complement), amb 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina. Les cèl·lules es cultiven en un incubador a una temperatura de 37°C i una atmosfera humida de 5 % de CO₂. Les cèl·lules Jurkat s'han de mantenir a una concentració que va des de 200.000 a 1,3x10⁶ cèl·lules/ml, i s'han d'anar efectuant substitucions de part del medi de cultiu per medi complet nou, per tal de mantenir la densitat cel·lular.

I.1.1. Criopreservació de les cèl·lules Jurkat.

Les cèl·lules Jurkat, es resuspenen en sèrum fetal boví inactivat i s'hi afegeix lentament la solució de criopreservació freda (medi RPMI 1640, 20% de sèrum fetal boví, 20% DMSO). Tot aquest procés s'ha de fer sobre gel. Seguidament es fan alíquotes d'1 ml en tubs de criopreservació de 2 ml (a una concentració de 5 X10⁶ cèl·lules/ml) i es deixen a -80°C dins d'un criopreservador de cèl·lules, o dins d'una gradeta de porexpan, durant tota la nit. Finalment els tubs es guarden en contenidors amb nitrogen líquid.

I.1.2. Descongelació de les cèl·lules Jurkat.

Les mostres criopreservades es retiren del contenidor de nitrogen líquid i es descongelen posant el tub de criopreservació en un bany d'aigua a 37°C. Quan la mostra es comença a descongelar, el contingut del tub es dilueix en un volum 10 vegades superior de medi RPMI 1640 amb 10% FBS a 37°C, i es renten per centrifugació, 5 minuts a 480xg. Un cop rentades, es descarta el sobrenadant (per tal d'eliminar les restes de DMSO) i les cèl·lules es dilueixen en medi complet.

I.1.3. Manipulació de les cèl·lules Jurkat abans de fer els experiments.

Abans de disparar qualsevol experiment amb les cèl·lules Jurkat, ja sigui per veure l'efecte de drogues o per fer experiments de transfecció, es recullen el número de cèl·lules necessàries per fer l'experiment i es centrifuguen a 480xg, per tal d'eliminar el

medi vell, i es dilueixen en medi RPMI 1640 complet a la densitat requerida per fer l'experiment.

I.2. OBTENCIÓ, CULTIU I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES DE LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE CÈL·LULES-B.

I.2.1. Recollida de mostres.

Cada dia es recullen les mostres de sang perifèrica de pacients amb LLC-B al Servei d'Hematologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Cada mostra s'identifica amb una numeració, i es recull en una base de dades on hi ha totes les mostres dels diferents pacients. A més, aquesta base de dades inclou per a cada mostra, el número assignat, el diagnòstic del pacient en el moment de la presa de mostra, el comptatge leucocitari total i el percentatge corresponent a limfòcits, o fórmula leucocitària completa si aquesta és disponible, així com qualsevol observació coneguda que es consideri rellevant (malaltia agressiva, tractament del malalt, etc.). En cap cas s'inclouen les dades personals del pacient, tal com s'estableix als comitès ètics de la Universitat de Barcelona i l'Hospital Universitari de Bellvitge. El diagnòstic de cada patologia es realitza mitjançant els criteris clínics i de laboratori estàndard. Els pacients donen el seu consentiment escrit per la utilització de les seves mostres en estudis de recerca, i els projectes desenvolupats estan avalats pels comitès ètics de la Universitat de Barcelona i de l'Hospital.

I.2.2. Separació de cèl·lules mononucleades.

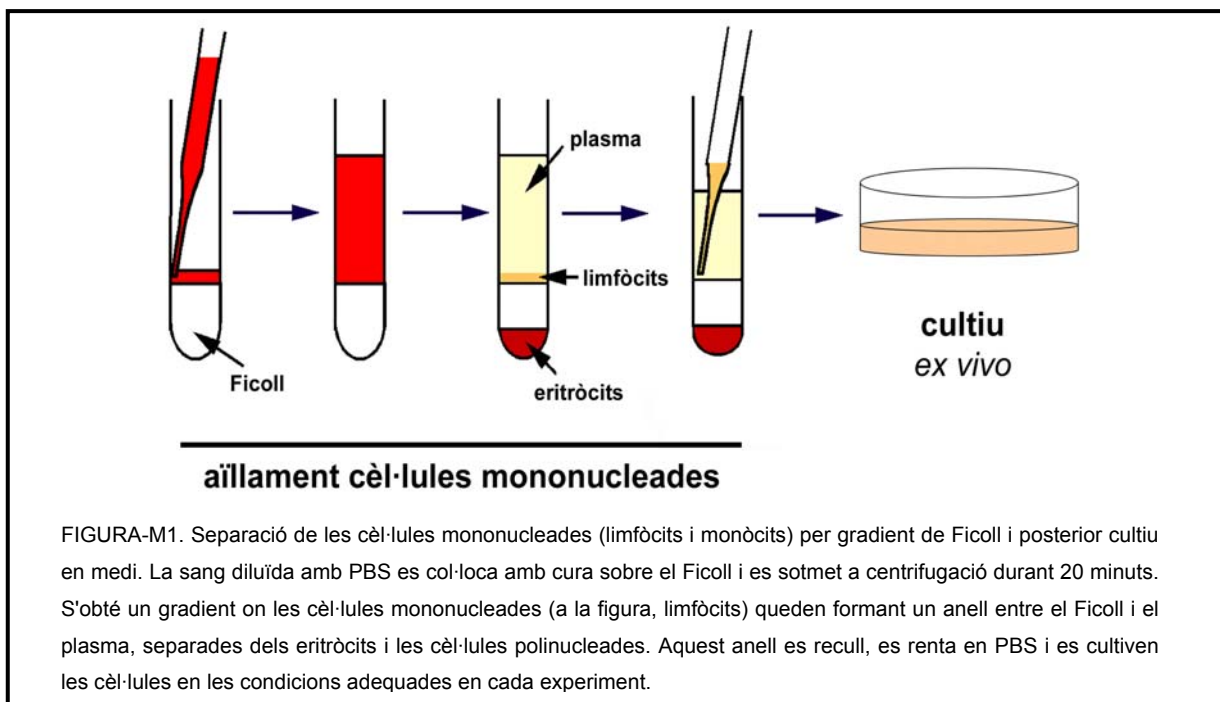
Les cèl·lules de LLC-B són limfòcits B, per tant cèl·lules mononucleades de densitat inferior als eritròcits, pel que sedimenten més lentament. Aquesta característica és aprofitada per separar les cèl·lules mononucleades seguint el protocol descrit per Böyum (Böyum, A., 1964) del gradient de Ficoll-Hypaque, amb algunes modificacions (Figura-M1):

- Diluir la mostra de sang en tampó fosfat salí (PBS) en proporció 1:1 (vol:vol)
- S'addiciona la sang diluïda a sobre la solució de Ficoll (densitat 1.077 g/ml) en una proporció de dos volums de sang diluïda per cada volum de solució de Ficoll.
- Es centrifuga durant 20 minuts a 850xg, a temperatura ambient i sense fre per no trencar el gradient de Ficoll. En la separació resultant els eritròcits i les cèl·lules polinucleades queden sedimentades en la part inferior del tub, mentre que les cèl·lules mononucleades queden sedimentades en la interfase entre el

Ficoll i el plasma formant un anell, i en la part superior del tub queden el plasma i les plaquetes.

- Es recull l'anell de cèl·lules mononucleades, i es renten en PBS per centrifugació (10 minuts a 480xg).

Tot el procés es realitza a temperatura ambient. Les cèl·lules mononucleades contenen limfòcits B, limfòcits T i monòcits. En les mostres de pacients de LLC-B la proporció de limfòcits B és tan elevada (superior al 90%) que es considera que no cal separar els limfòcits T i els monòcits per realitzar els experiments. Les cèl·lules mononucleades separades poden utilitzar-se en el moment de la separació (experiments amb cèl·lules mononucleades fresques) o bé criopreservar-les en nitrogen líquid (experiments amb cèl·lules mononucleades congelades).



I.2.3. Criopreservació de les cèl·lules de LLC-B.

Les cèl·lules mononucleades obtingudes en la separació per gradient de Ficoll es resuspenen en sèrum fetal boví inactivat per calor (30 minuts a 56°C) a una concentració 20×10^6 cèl·lules/ml. La suspensió resultant es posa en gel i s'afegeix lentament un volum igual de solució de criopreservació amb dimetilsulfòxid (DMSO). Tot aquest procés s'ha de fer sobre gel. La solució de criopreservació conté Medi RPMI 1640, FBS i DMSO en proporció 3:1:1. La mostra s'aliquota en tubs de

criopreservació de 2 ml (a una concentració de 10×10^6 cèl·lules/ml) que es deixen a -80°C dins de un criopreservador de cèl·lules, o dins d'una gradeta de porexpan, durant tota la nit. Finalment els tubs es guarden en contenidors amb nitrogen líquid.

I.2.4. Descongelació de les cèl·lules de LLC-B.

Les mostres criopreservades es retiren del contenidor de nitrogen líquid i es descongelen posant el tub de criopreservació en un bany d'aigua a 37°C . Quan la mostra es comença a descongelar, el contingut del tub es dilueix en un volum 10 vegades superior de medi RPMI 1640 amb 10% FBS a 37°C i es renta per centrifugació, 10 minuts a $480 \times g$. Un cop rentada, es descarta el sobrenadant (per tal d'eliminar les restes de DMSO) i les cèl·lules es dilueixen en medi complet. Les cèl·lules descongelades s'han de deixar reposar un mínim de dues hores a l'incubador abans de fer els tractaments experimentals convinguts.

I.2.5. Cultiu cel·lular de LLC-B.

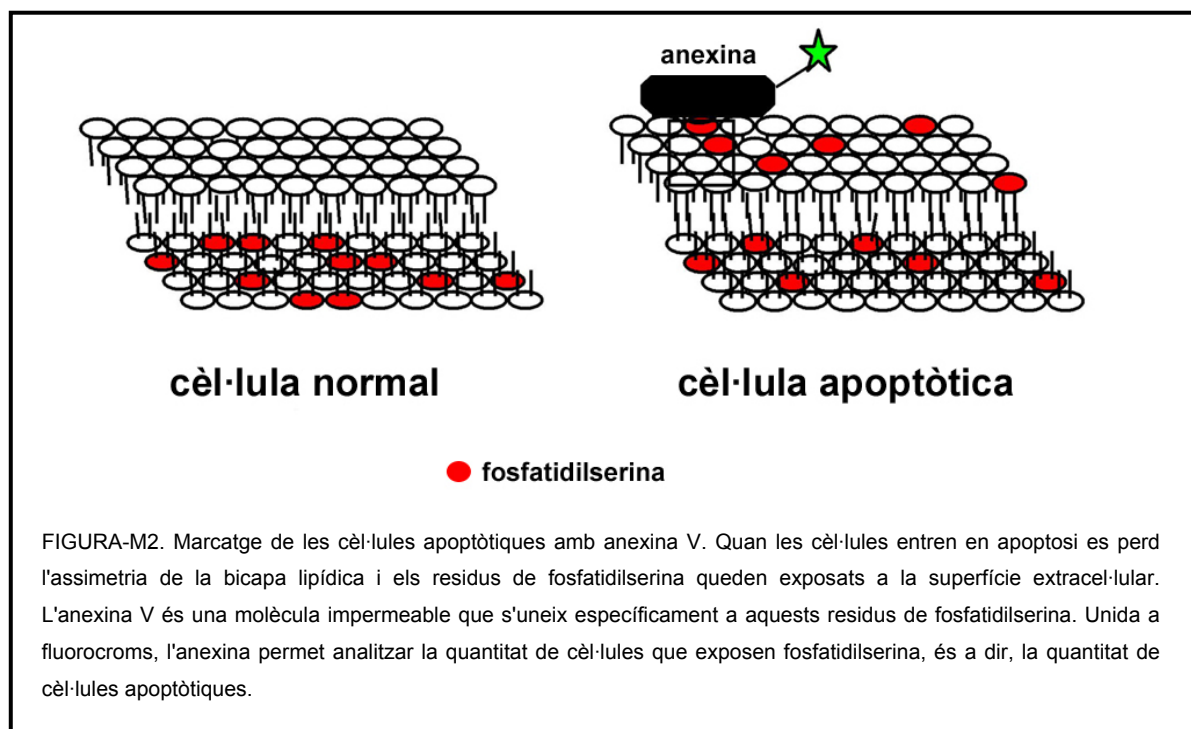
Les cèl·lules, descongelades o acabades de separar, es cultiven en RPMI complet suplementat amb 10% de FBS inactivat, suplementat amb 2 mM L-glutamina i antibiòtics (100 U/ml de penicilina i 100 $\mu\text{g/ml}$ d'estreptomicina), en medi humit (humitat del 95%) al 5% de CO_2 i a 37°C de temperatura. Les cèl·lules es cultiven en presència dels factors corresponents a cada experiment, a concentració de 0,5 a 6×10^6 cèl·lules/ml, durant el temps establert per a cada tipus d'assaig.

I.3. ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR PER CITOMETRIA DE FLUX.

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina mitjançant el doble marcatge amb anexina-V conjugada amb FITC i la incorporació de iodur de propidi.

Fonament de la tècnica: La membrana cel·lular està formada per una bicapa lipídica de distribució asimètrica. Un dels fosfolípids que componen la bicapa és la fosfatidilserina, que a les cèl·lules vives es troba exclusivament a la capa interna. En condicions d'apoptosi primerenca es perd l'assimetria de la membrana i s'exposa fosfatidilserina a la bicapa externa cel·lular (procés de translocació o "*Flip-Flop*") (Figura-M2). L'anexina V és una proteïna que uneix lípids de forma dependent de l'ió calci (Ca^{2+}), que té una gran afinitat per la fosfatidilserina. L'anexina V es conjuga amb diferents fluorocroms que poden ser detectats per citometria. En processos d'apoptosi avançada i necrosi la membrana plasmàtica es deteriora i esdevé permeable a

substàncies com el iodur de propidi (IP) que s'intercala en la doble cadena de molècules d'àcids nucleics; el IP s'excita a 536 nm i emet fluorescència en un rang ampli al voltant de 617 nm. La viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina per citometria de flux, mitjançant el doble marcatge cel·lular amb anexina V conjugada amb FITC i iodur de propidi (IP) (Bellosillo et al., 1998). Així s'obté el percentatge de cèl·lules vives (anexina i IP negatives), el percentatge de cèl·lules apoptòtiques primerenques (positives pel marcatge amb anexina i negatives per IP), i el percentatge de cèl·lules amb apoptosi avançada o necrosi (anexina i IP positives). La presència d'una població positiva per anexina i negativa per IP permet diferenciar el procés apoptòtic d'un procés necròtic. Aquestes tècniques són aplicables a cèl·lules de LLC-B i Jurkat.

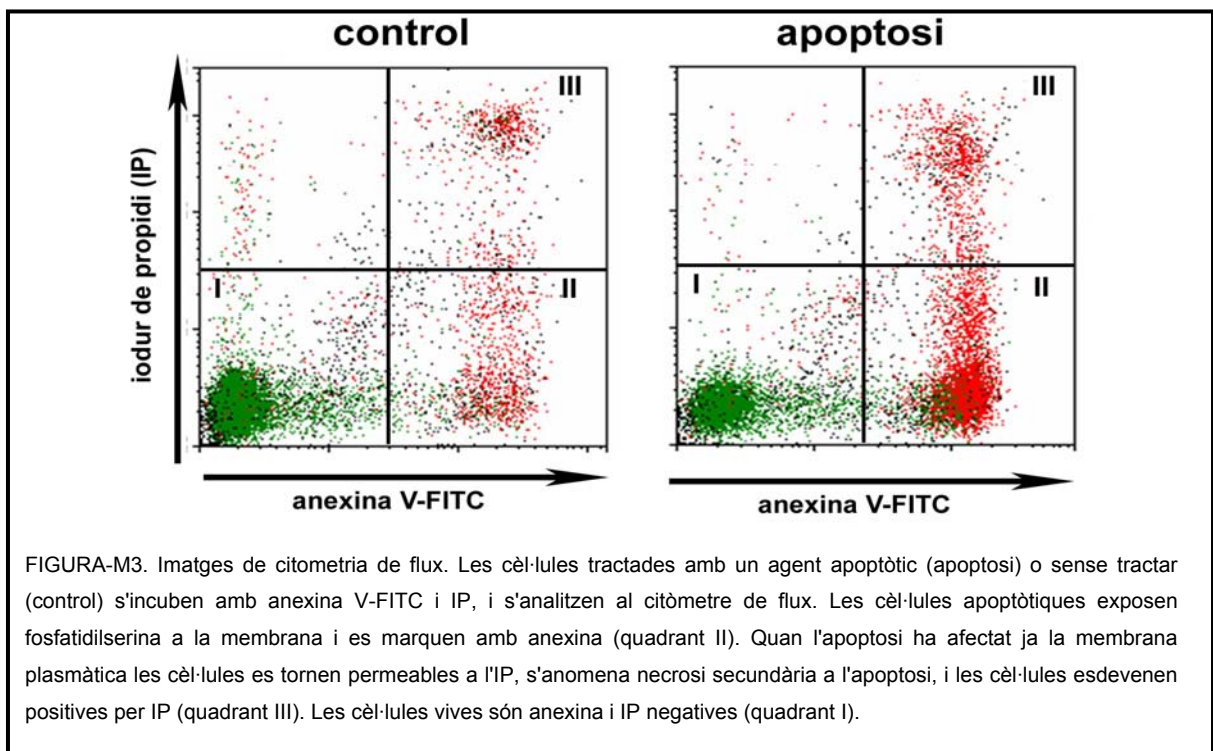


I.3.1. Protocol per l'anàlisi de la viabilitat cel·lular per citometria de flux.

- S'incuben $2,5 \times 10^5$ cèl·lules en presència dels factors corresponents durant el temps indicat en cada cas.
- Es recullen les cèl·lules i es renten amb tampó d'unió d'anexina (ABB, de *Annexin Binding-buffer*, Taula-M1). Es centrifuguen 10 minuts a 480xg.
- Es resuspenen les cèl·lules en 100 μ l de tampó ABB amb 1 μ g/ml d'anexina V-FITC i s'incuben durant 15 minuts a les fosques i temperatura ambient.
- A continuació es dilueixen a la meitat amb tampó ABB i IP a concentració final 1 μ g/ml.

- Les mostres s'analitzen per citometria de flux mitjançant un citòmetre FACSCalibur (Becton Dickinson). L'anàlisi de les dades es realitza amb un *software* informàtic específic, com els programes CellQuest (Becton Dickinson) i WinMDI (Figura-M3).

La viabilitat cel·lular es representa com el percentatge de cèl·lules annexina V negatives i IP negatives. Cada condició de l'experiment es realitza per duplicat i els resultats s'expressen en forma de mitjana \pm desviació estàndard.



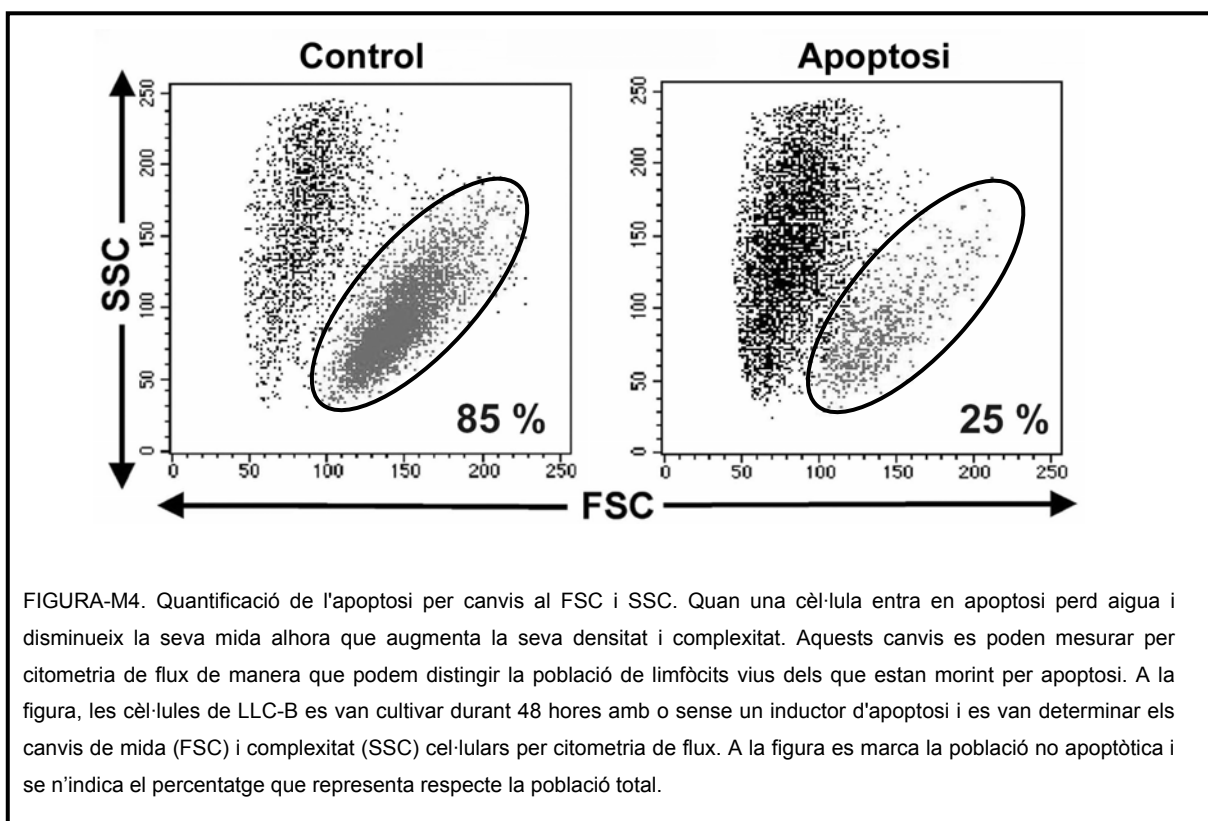
En condicions en què no es poden utilitzar fluorocroms per a determinar l'apoptosi per citometria cal recórrer a altres mètodes de quantificació. Al entrar en apoptosi, les cèl·lules pateixen una disminució del volum cel·lular per pèrdua d'aigua, que provoca una reducció en la mida i un augment de la seva densitat, paràmetres quantificables per citometria de flux per Forward Scatter (FSC) i Side Scatter (SSC) respectivament (una cèl·lula apoptòtica té menor FSC i major SSC que una cèl·lula viva). Es segueix el següent protocol.

I.3.2. Protocol per determinar l'apoptosi per citometria en condicions en què no es poden utilitzar fluorocroms.

- S'incuben $2,5 \times 10^5$ cèl·lules en presència dels factors corresponents durant el temps indicat en cada cas.

- Es recullen les cèl·lules i es renten amb PBS, centrifugant 10 minuts a 480xg.
- Es resuspenen amb PBS abans de ser analitzades.
- Les mostres s'analitzen per citometria de flux mitjançant un citòmetre FACSCalibur (Becton Dickinson). L'anàlisi de dades es realitza mitjançant un *software* informàtic específic, com el programa CellQuest (Becton Dickinson) i WinMDI (Figura-M4).

Cada condició de l'experiment es realitza per duplicat i els resultats s'expressen en forma de mitjana \pm desviació estàndard.



I.4. ANÀLISI DE POBLACIONS CEL·LULARS PER CITOMETRIA DE FLUX.

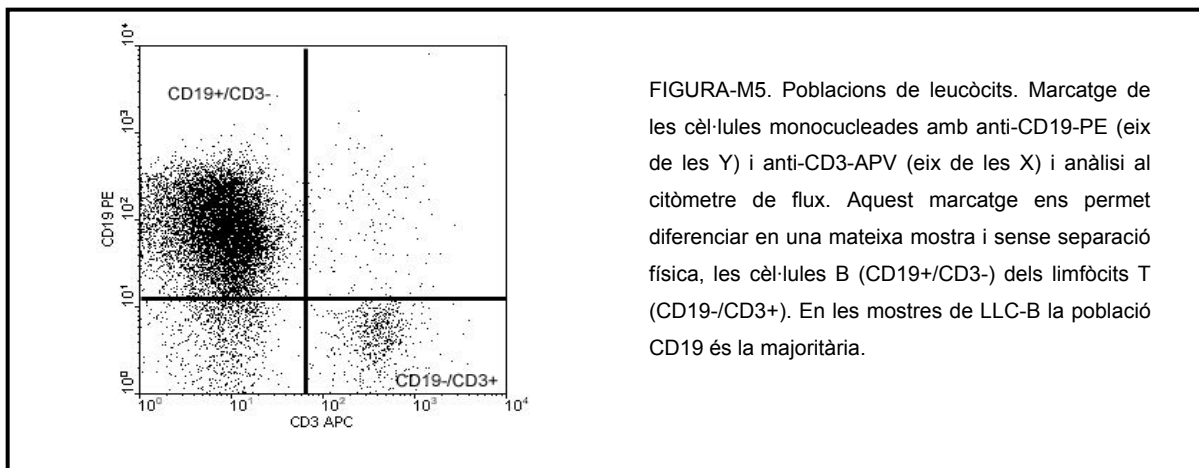
La composició de les fraccions cel·lulars obtingudes durant la separació de cèl·lules mononucleades s'avalua per citometria de flux, aprofitant l'expressió d'alguns marcadors cel·lulars específics de la superfície dels limfòcits B i T. Mitjançant el marcatge amb anexina V conjugada a FITC també sabem la viabilitat de cada una de les poblacions cel·lulars.

Fonament de la tècnica: Per estudiar la composició cel·lular d'una suspensió de cèl·lules mononucleades s'utilitzen anticossos marcats amb fluorocroms que reconeixen específicament marcadors poblacionals de membrana. CD3 és un marcador de membrana propi de limfòcits T i CD19 és el marcador propi dels limfòcits B.

Protocol per l'anàlisi de poblacions cel·lulars per citometria de flux.

- Partim de 5×10^5 cèl·lules mononucleades que es renten amb PBS, centrifugant 10 minuts a 480xg.
- S'incuben les cèl·lules amb 50 μ l d'ABB (Taula-M1) i quantitat no limitant d'anticòs anti-CD3 marcat amb al·lofocianina (APC) i d'anticòs anti-CD19 marcat amb ficoeritrina (PE), durant 10 minuts a les fosques (es posen 2 μ l de cada anticòs).
- S'afegeix 100 μ l de tampó ABB amb 1 μ g/ml d'anexina V-FITC i s'incuben durant 15 minuts a les fosques i temperatura ambient.
- Es dilueixen les cèl·lules a un volum final de 300-500 μ l just abans de ser analitzades al citòmetre de flux mitjançant un *software* informàtic específic, com el programa CellQuest (Becton Dickinson) i WinMDI (Figura-M5).

Per tal que els percentatges poblacionals siguin fiables, cal analitzar un mínim de 5.000 cèl·lules de cadascuna de les poblacions d'interès.



II. PROTEÏNA.

II.1. LISI CEL·LULAR i EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES.

Segons la tècnica que vulguem realitzar, ens pot interessar una extracció total de proteïnes mitjançant una lisi desnaturalitzant o bé una extracció que permeti l'enriquiment en proteïnes d'alguna de les fraccions cel·lulars o que les proteïnes conservin les seves activitats característiques. Depenent de la tècnica utilitzada el protocol de lisi és diferent, així com també el número de cèl·lules necessàries per fer-lo.

II.1.1. Lisi desnaturalitzant. Extracció total de proteïnes.

Aquesta extracció proteica permet obtenir el total de proteïnes cel·lulars de forma desnaturalitzada i inactiva. Es fonamenta en la presència del detergent aniònic dodecil sulfat de sodi (SDS) al tampó d'extracció, que interacciona fortament amb les proteïnes induint una conformació cilíndrica-globular i eliminant totes les interaccions hidrofòbiques, de manera que es solubilitzen totes les proteïnes, i a més, actua com agent desnaturalitzant, eliminant així les activitats enzimàtiques (Laemmli, U.K., 1970).

Protocol d'extracció.

- S'ha de partir de $3 \cdot 10^6$ cèl·lules per cada una de les condicions experimentals.
- Es renten les cèl·lules per centrifugació 5-10 minuts a 480xg (depenent del model cel·lular utilitzat). Es lisen les cèl·lules en calent (40-50°C) amb 100µl (per cada $3 \cdot 10^6$ cèl·lules) de tampó de lisi total (SB).
- Les cèl·lules es resuspenen per agitació al vòrtex durant 30-60 segons i es bullen al bany sec a 95°C durant 10 minuts.
- Per obtenir la lisi completa, fer un pols de centrífuga i tornar a repetir el procés d'agitació i de bullir les mostres fins que quedin ben homogeneïtzades.

El tampó SB s'utilitza com a tampó de càrrega per les electroforesis SDS-PAGE, ja que les proteïnes es separen per la seva massa molecular.

II.1.2. Lisi no desnaturalitzant.

Aquesta extracció proteica permet obtenir les proteïnes tal i com es troben en el seu estat natural, pel que conserven les seves característiques. Per aquest motiu cal treballar sobre gel i en presència d'inhibidors de proteases.

II.1.2.1. Extractes totals.

La tècnica es fonamenta en la utilització d'un detergent no iònic (Tritó X-100 al 1%), que és capaç de destruir les membranes biològiques sense desnaturalitzar les proteïnes, pel què s'obtenen de manera nativa la majoria de les proteïnes cel·lulars.

Protocol d'extracció:

- S'ha de partir de 1×10^7 cèl·lules per cada una de les condicions experimentals.
- Es renten les cèl·lules per centrifugació 5-10 minuts a 480xg (depenent del model cel·lular utilitzat). Es lisen amb 200 μ l (per cada 1×10^7 cèl·lules) de tampó de lisi total no desnaturalitzant (tampó RIPA).
- Les cèl·lules lisades es deixen en gel (a 4°C) durant 15 minuts per provocar la ruptura de les membranes.
- Agitació (vòrtex) durant aproximadament 30 segons-1 minut.
- Es centrifuga el lisat 15 minuts a 4000xg i en fred per obtenir una solució de proteïnes solubles.
- Recuperar el sobrenedant, que conté l'extracte citoplasmàtic enriquit (representa la fracció citosòlica), que es traspassa a un a nou tub eppendorf.

II.1.2.2. Separació de citosol i proteïnes associades a membranes. Extracció proteica fraccionada.

En aquest cas ens interessa obtenir les proteïnes solubles del citosol, i separadament les associades a membranes o als diferents orgànuls cel·lulars, pel que es sol fer la lisi amb el tampó de lisi amb digitonina.

Protocol d'extracció:

- S'ha de partir de 3×10^7 cèl·lules per cada una de les condicions experimentals.
- Es renten les cèl·lules per centrifugació 5-10 minuts a 480xg (depenent del model cel·lular utilitzat). Es lisen a 4°C amb 130 μ l de tampó de lisi amb digitonina (temps de lisi molt breu).
- Les cèl·lules lisades es centrifuguen a 4000xg a 4°C durant 3 minuts.
- El sobrenedant obtingut correspon a la fracció citosòlica i es lisa afegint 40 μ l de SB 4X.
- El pellet, que correspon a la fracció de nuclis i mitocondris, es lisa amb 300 μ l de SB 1X.

Les mostres obtingudes amb una lisi desnaturalitzant són molt estables i es poden guardar a -20°C , i ser descongelades a temperatura ambient, ja que el SDS precipita en fred. En canvi, els extractes proteics obtinguts per lisi no desnaturalitzant són molt làbils, pel que s'han de mantenir a -20 o -80°C i ser descongelats lentament amb gel, i també evitar les congelacions-descongelacions successives. A la Taula-M1 es mostren els principals tampons i solucions per la lisi de proteïnes i per fer citometria.

TAMPÓ	COMPOSICIÓ
PBS (Tampó fosfat salí) pH = 7.4	NaCl 140 mM, KCl 0.27 mM, Na_2HPO_4 0.81 mM, KH_2PO_4 0.18 mM
ABB (Tampó d'unió d'anexina) pH = 7.4	HEPES-NaOH 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM
Tampó lisi amb digitonina	Tris (pH 6.8 1M) mM, Sucrosa 250 mM, EDTA 1 mM, Pepstatina $1\mu\text{g/ml}$, Leupeptina $1\mu\text{g/ml}$, Aprotinina $1\mu\text{g/ml}$, Benzamidina 1 mM, Digitonina 0.1% DTT 1 mM, PMSF 0.1 mM
Tampó de lisi RIPA	Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, Tritó X-100 1%, Ortovanadat sòdic 1 mM, Fluorur sòdic 50 mM, EDTA 5 mM, β -Glicerofosfat 40 mM, NaCl 100 mM PMSF 1 mM, Pepstatina $1\mu\text{g/ml}$, Leupeptina $1\mu\text{g/ml}$, Aprotinina $1\mu\text{g/ml}$, Benzamidina 1 mM
SB (Tampó de lisi total)	Tris-HCl (pH 6.8) 80 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, DTT 0.1M

TAULA-M1. Principals tampons i solucions per la lisi de proteïnes i citometria de flux.

II.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES.

La quantificació del contingut proteic de les diferents extraccions es realitza mitjançant el *Micro BCA Protein Assay Reagent kit* (de Pierce), en plaques de 96 pous i utilitzant el lector multiplaques a 550 nm. Es basa en una determinació colorimètrica quantitativa que utilitza l'àcid bicinrònic (BCA) per detectar el Cu^{1+} que es forma quan el Cu^{2+} és reduït per les proteïnes en un entorn bàsic. Dues molècules de BCA quelen una molècula de Cu^{1+} i el complex resultant presenta color mesurable, linealment proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra. Aquesta quantificació permet normalitzar la tècnica de Western Blot igualant la quantitat de proteïna analitzada per a cada condició experimental.

II.3. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT.

II.3.1. Preparació de les mostres.

Les mostres, quantificades i igualades en quantitat de proteïna i volum final, es tracten en condicions desnaturalitzants i reductores en presència del tampó SB-1X, 100 mM de DTT i blau de bromofenol (indicador del procés d'electroforesi), i s'escalfen a 95°C durant 10 minuts. La quantitat de proteïna i volum final de les mostres pot variar en funció de l'experiment. Es carreguen entre 10 i 70 µg de proteïna depenent de l'abundància de la proteïna que es vulgui determinar o de l'afinitat que té l'anticòs utilitzat per a detectar-la. El volum final de la mostra depèn en gran mesura de com estiguin de diluïts els extractes proteics.

II.3.2. Electroforesi, transferència i incubació amb l'anticòs.

Els gels SDS-PAGE es preparen al percentatge adequat d'acrilamida (proporció 37,5:1, acrilamida:bisacrilamida, Bio-Rad) en funció del pes molecular de la proteïna o proteïnes que es vulguin separar i analitzar en cada cas (7-20%). Quan menor és el pes de la proteïna objecte d'estudi, major ha de ser el percentatge d'acrilamida present al gel. La proporció concentradora del gel es prepara de forma constant al 3% d'acrilamida.

Protocol d'electroforesi:

- Les mostres s'apliquen als pous generats al gel concentrador i es realitza l'electroforesi en cubetes adequades i tampó d'electroforesi, per aplicació de corrent elèctric (aproximadament 30-40 mA/gel).
- Un cop finalitza l'electroforesi es transfereixen les proteïnes del gel a membranes de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA), activades en metanol i hidratades en aigua. La transferència es realitza en cubetes adequades amb tampó de transferència a un amperatge de 400 mA durant 1 hora 30 minuts, i a 4°C per tal d'evitar l'escalfament de les membranes.
- Les membranes es renten en tampó TBS-T i es bloquegen les unions inespecífiques per tractament de la membrana amb solució de bloqueig durant aproximadament 1 hora a temperatura ambient.
- Incubació de la membrana amb l'anticòs primari diluït en tampó TBS-T, durant 2 hores a temperatura ambient o 12-20 hores a 4°C.
- Rentats de la membrana amb tampó TBS-T i incubació amb l'anticòs secundari.

- Rentats de la membrana amb TBS-T i tampó TBS. El secundari està conjugat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP) i permet detectar les proteïnes reconegudes per l'anticòs primari mitjançant la solució de detecció de quimioluminescència (ECL, Amersham).
- S'exposa la membrana amb pel·lícula fotogràfica durant diferents temps, segons l'anticòs utilitzat i els nivells d'expressió de la proteïna d'interès. La pel·lícula es revela per mètodes tradicionals (revelador, fixador).

II.3.3. Deshibridació de membranes.

Per reutilitzar una membrana després de realitzar Western Blot i detectar altres proteïnes cal deshibridar els anticossos units en la primera hibridació. La membrana es submergeix en la solució de deshibridació (calen condicions desnaturalitzants a la membrana de PVDF: temperatura (56°C), 2% SDS, pH=6.8 i β -mercaptoetanol), en un bany a 50-60°C durant 30 minuts i en agitació. Cal rentar abundantment la membrana amb TBS-T abans de la seva reutilització.

A la Taula-M2 s'indiquen els principals tampons per a fer el Western blot i a la Taula-M3 els anticossos utilitzats a la Tesi.

REACTIUS NECESSARIS PEL WESTERN BLOT	
PREPARACIÓ DELS GELS	
Tampó Concentrador (4x)	pH=6.8, 0.5 M Tris, SDS 0.4%
Tampó Separador (4x)	pH=8.8, 1.5 M Tris, 0.4 % SDS
Persulfat amònic 13% en H ₂ O i TEMED	
ELECTROFORESI I TRANSFERÈNCIA	
Tampó d'electroforesi (10x)	pH=8.3, 250 mM Tris, 1.92 M Glicina, 1% SDS
Tampó de transferència (10x)	pH=8.3, 250 mM Tris, 1.92 M Glicina
Tampó de transferència (1x)	pH=8.3, 25 mM Tris, 0.192 M Glicina metanol: 10% per PM >30 kDa i 20% per PM <30 kDa
IMMUNODETECCIÓ	
TBS (Tris Buffered Saline) 10x	pH=7.4, 200 mM Tris-HCl, 1370 mM NaCl
TBS-T	TBS 1x, 0.1% Tween-20
Solució de bloqueig	TBS-T, 5% llet en pols 0.05% de NaN ₃ per diluir els anticossos primaris.
DESHIBRIDACIÓ	
Tampó de deshibridació	pH= 6.8, 62.5 mM Tris, 2% SDS 100 mM β-mercaptoetanol .

Taula-M2. Principals tampons per a fer el Western blot.

ANTICÒS	EPÍTOP	DILUCIÓ	ORIGEN*	CASA COMERCIAL
Akt-P Ser 473	Fosfo-Ser-473	1:1000	C	New England Biolabs
Bcl-2	Aà. 41-54	1:1000	R	Dako
BIM	Aà. 22-40	1:1000	C	BD Pharmingen
caspara-9	Entorn aà. 330	1:500	C	New England Biolabs
caspara-3	Aà.1-219	1:1000	R	Transduction Laboratories
eIF2α	-		C	Santa Cruz
eIF2α-P	Fosfo-Ser-51		C	Cell Signaling
Id1			C	Santa Cruz
MAPK-P (Thr202/Tyr204)	Entorn Thr202/Tyr204	1:2000	R	New England Biolabs
Mcl-1	Domini intern	1:1000	C	Santa Cruz
p21	Extrem C-terminal	1:100	C	Santa Cruz
PARP	Proteïna completa	1:1000	C	Boehringer Mannheim
α-tubulina		1:500	R	Molecular Probes
XIAP	Aà. 268-426	1:250	R	BD Transduction

TAULA-M3. Anticossos primaris utilitzats per a Western Blot (C = conill; R = ratolí).

II.4. ASSAIG D'INCORPORACIÓ DE LEUCINA TRITIADA PER QUANTIFICAR LA TAXA DE SÍNTESI PROTEICA.

Per cada una de les condicions d'estudi, s'incuben 2×10^6 cèl·lules Jurkat (o les cèl·lules d'estudi) en medi RPMI que conté leucina tritiada ($[^3\text{H}]$ -leucine, 42.5 Ci/mol) en la presència o absència d'aspirina (10 mM), o la droga assajada, durant el temps d'interès per l'estudi temporal de l'efecte de la droga en els nivells de síntesi proteica; es segueix el següent protocol:

- Les cèl·lules es recullen a diferents temps per centrifugació i són rentades amb PBS amb leucina freda (0.5 mg/ml).
- Les cèl·lules són lisades amb el tampó IGEPAL (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM acetat de potassi, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamida, i 0.25% Igepal).
- Es centrifuguen a 12.000xg durant 30 minuts a 4°C. Es separa i guarda el sobrenedant.
- Una alíquota del sobrenedant serà utilitzada per mesurar la quantitat de proteïna total. La resta de la mostra serà precipitada amb TCA (concentració final 10%).
- Després de centrifugar les mostres (12.000xg durant 30 minuts a 4°C) es recull el sobrenedant (fracció soluble).
- El pellet es resuspen en 100 μl de NaOH 0.2 M (fracció TCA).
- Un cop separades les dues fraccions es determina la quantitat de leucina tritiada que conté cada una de les fraccions de cada punt; s'afegeix líquid de centelleig (Biogree 103) a la fracció soluble i a la fracció de TCA, i es compten les cpm (comptes per minut) en un comptador de líquid de centelleig (Wallac 1409).

Els resultats s'expressen com a [cpm fracció TCA / (cpm fracció soluble X mg proteïna)].

III. MISSATGER.

III.1. OBTENCIÓ DE L'RNA MISSATGER TOTAL D'UNA MOSTRA.

Per obtenir l'RNA missatger total d'una mostra, cal partir d'un nombre elevat de cèl·lules, entre $8-14 \times 10^6$ cèl·lules si es treballa amb Jurkat o entre $14-16 \times 10^6$ cèl·lules si són mostres de pacients de LLC-B. Sempre que vulguem aïllar l'RNA d'una mostra, cal treballar amb material autoclavat lliure de RNases i en fred (s'acostuma a treballar sobre gel). Per a fer aquest procediment, utilitzem el reactiu Ultraspec (de Biotecx), d'acord amb el protocol del fabricant.

En el lisat de les cèl·lules, si estem treballant amb cèl·lules de LLC-B, cal fer passar l'extracte a través d'una xeringa amb agulla de 20G varies vegades. L'RNA final, es resuspèn en la quantitat adequada d'aigua DEPC, ressuspenent-lo a 65°C , i amb ajut de la pipeta. Les mostres d'RNA total es quantifiquen per espectrofotometria.

III.2. ANÀLISI DELS NIVELLS DE MISSATGER PER NORTHERN BLOT.

Un cop obtingut l'RNA total (mitjançant el protocol del reactiu Ultraspec prèviament explicat), es segueix el següent protocol:

- Per cada condició d'estudi es carreguen de 15 a 30 μg d'RNA total, que és desnaturalitzat amb el tampó de mostra (3 volums respecte el volum d'RNA) i escalfant a 65°C durant 10 minuts. Després es deixen les mostres 5 minuts en gel. Afegir el tampó de càrrega.
- Electroforesi en gels d'agarosa al 2% amb formaldehid.
- Un cop el gel ha corregut el desitjat per tal que es separin bé els missatgers d'estudi, l'RNA és transferit a membranes de niló (Hybond- N^+ , Amersham) durant tota la nit, amb tampó SSC-10X.
- L'RNA, un cop transferit s'ha de fixar 2 hores a 80°C .
- Cal fer una preincubació de la membrana, de 2 a 6 hores a 42°C , amb una solució de prehibridació que contingui $100\mu\text{g/ml}$ d'esperma de salmó o algun altre DNA en excés per tal de bloquejar els llocs de la membrana on no s'hi ha unit cap missatger, per evitar les unions inespecífiques de la sonda.
- Per a fer la hibridació amb la sonda específica del gen (que es pot obtenir per purificació a partir d'una amplificació per PCR o bé per digestió d'un insert del gen clonat en un plàsmid) marcada radioactivament, primer cal marcar la

sonda. Les sondes es marquen amb fosfor-32 ($^{32}\text{-P}$) mitjançant el kit comercial de *random-primer Rediprime II – Random Prime Labelling System* (Amersham Biosciences) d'acord amb el protocol del fabricant, utilitzant [α - $^{32}\text{-P}$]dCTP (3000 Ci/mmol). Quantificació del marcatge amb un comptador de cpm. La quantitat de sonda marcada utilitzada depèn de cada sonda i del nivell d'expressió del gen d'estudi.

- La hibridació de les membranes amb la sonda marcada radioactivament es fa a 42°C (igual que la prehibridació) durant tota la nit (en solució d'hibridació).
- Un cop feta la hibridació de la sonda cal rentar la membrana amb SSC 0.1% i SDS 0.1% a la temperatura de 50-60°C (el percentatge d'aquestes sals i la temperatura de rentat poden variar, depenent de l'astringència a la que vulguem rentar les membranes, que depèn del percentatge d'homologia de les sondes i de si són homòlogues o heteròlogues). Es fan diversos rentats.
- S'exposen les membranes marcades radioactivament amb pel·lícules fotogràfiques a -80°C durant períodes més o menys llargs de temps, o amb pantalles de phosphoimager, segons les condicions del Northern i el nivell de marcatge. La visualització del senyal es fa mitjançant un revelat fotogràfic convencional o al phosphoimager respectivament.

Per a missatgers de mida gran, com XIAP, cal fer un tractament alcalí (NaOH 0.05 M, NaCl 1.5 M durant 15 minuts) al gel d'agarosa, seguit d'un tractament de neutralització (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1.5 M) i rentats, abans de realitzar la transferència a la membrana de niló, per tal d'afavorir la transferència d'aquests missatgers de mida gran.

A la Taula-M4 s'indiquen els principals tampons per a fer el Northern blot.

REACTIUS NECESSARIS PEL NORTHERN BLOT	
PREPARACIÓ DELS GELS I ELECTROFORESI	
Agarosa, Formamida desionitzada	
MOPS (10x)	pH=7.4, 0.2 M MOPS, 50 mM Acetat sòdic, 5 mM EDTA
Tampó mostra RNA	6% formaldehid, 50% formamida desionitzada, 20 µg/ml bromur d'etidi
Tampó de càrrega (10x)	50% glicerol, 0.4% blau bromofenol, 0.4% xilè cianol
Gel d'agarosa	Gels al 2%: 2.2g agarosa, 40 ml MOPS-10x, 144 ml aigua, 36 ml formaldehid
Tampó electroforesi	MOPS-1x amb aigua-DEPC (o autoclavada)
TRANSFERÈNCIA	
SSC (20x)	pH=7.4, 3 M NaCl, 0.3 M Citrat sòdic
Transferència	Protocol convencional (per capilaritat del tampó)
Tampó transferència	SSC-10x
PREHIBRIDACIÓ I HIBRIDACIÓ	
Solució prehibridació	5 ml formamida, 3 ml SSC-20x, 1 ml Denhart-50x, 500 µl SDS-10x, 200 µl esperma de salmó (preparat a 10 mg/ml)
Solució hibridació	Igual que la solució de prehibridació (es pot afegir 1 g sulfat de dextrà per cada 10 ml solució), però amb la sonda marcada
RENTATS	
Solució rentats	0.1 % SDS, 0.1% SSC (variable segons astringència rentats)

Taula-M4. Principals tampons per a fer el Northern blot.

III.3. OBTENCIÓ DE cDNA PER RT-PCR.

Abans de poder fer la tècnica de la PCR quantitativa de temps real, cal obtenir el cDNA de les mostres d'estudi, mitjançant la retrotranscripció de l'RNA total. S'utilitza el *kit* comercial de *Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads* (Amersham Biosciences) i es segueix el protocol del fabricant. La retrotranscripció es fa amb random hexamers (Applied Biosystems), per tal d'amplificar tots els missatgers de les mostres d'estudi. La reacció es fa a 37°C durant 2 hores.

III.4. ANÀLISI DELS NIVELLS DE MISSATGER PER PCR QUANTITATIVA.

El cDNA obtingut de les mostres a estudiar (una alíquota de la retrotranscripció feta, segons la quantitat d'RNA de la què hem partit), s'utilitza com a motlle per amplificar-se mitjançant la PCR-quantitativa. Per detectar la modulació de cada missatger d'estudi es fan servir els kits predissenyats *Assay on Demand Gene Expression* (PE Applied Biosystems) específics per cada un d'ells. Aquests kits contenen *primers* i sondes fluorescents específiques *Taqman* que permeten la monitorització de la PCR. Les dades es processen amb l'aparell *ABI Prism 7700 Sequence Detection system* (PE Applied Biosystems) i el *software Sequence Detector Software* (SDS version 1.9; Applied Biosystems) que es troben als Serveis Científicotècnics de la Facultat de Medicina-Odontologia del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona.

IV. DNA

IV.1. EXTRACCIÓ DEL DNA GENÒMIC.

L'extracció del DNA genòmic es fa mitjançant el kit comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Alemanya), seguint les instruccions del fabricant. El teixit de partida és diferent en cada cas:

IV.1.1. DNA genòmic de limfòcits.

Per l'anàlisi de la presència de les insercions en els malalts de LLC-B o dels individus sans, partim o bé de sang total (en la minoria del casos) o bé de les cèl·lules mononucleades separades mitjançant un gradient de Ficoll. En les mostres en què fem l'extracció després d'haver fet un gradient de Ficoll podem assegurar que ho fem a partir d'una població molt majoritària de limfòcits B, tot i que també hi ha limfòcits T i monòcits. En les mostres on partim de sang total, l'extracció del DNA és a partir de les diferents poblacions cel·lulars presents a la sang. El DNA és resuspès amb aigua autoclavada i es guarda a 4°C.

IV.1.2. DNA genòmic de cèl·lules de l'epiteli bucal d'individus sans control.

Es fa un raspall de les cèl·lules epitelials de les parets de la cavitat bucal amb un escuradent. Les cèl·lules es resuspenen en 200 µl de PBS i es realitza l'extracció de DNA amb el Kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Alemanya). El DNA és resuspès amb aigua autoclavada i es guarda a 4°C.

IV.2. AMPLIFICACIÓ DE LA ZONA ON HI HA LES INSERCIONS PER PCR.

Es van dissenyar uns *primers* de PCR que amplifiquen una zona de 99 parells de bases on hi ha el lloc d'inserció al promotor d'*mcl-1* dels fragments de 6 o 18 nucleòtids. Els *primers* dissenyats van ser: *primerF*: 5'-gcactcagagcctccgaaga-3', i *primerR*: 5'-gcgcacggcacctaccagct-3'. La reacció de PCR es fa en un volum de 50 µl en condicions estàndard amb un cicle d'amplificació de 35 cicles (desnaturalització a 94°C durant 30 segons, anellament dels *primers* a 58°C durant 1 minut i extensió a 72°C durant 30 segons), i una extensió final a 72°C durant 10 minuts, en un termociclador Perkin Elmer.

Els productes de PCR, 15 µl de la reacció, es visualitzen per electroforesi en gels d'acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 10%, tenyits posteriorment amb bromur d'etidi i visualitzat en un transiluminador de llum ultraviolada. En els casos on no hi ha inserció s'amplifica una banda de 99 parells de bases, i en els casos on hi ha inserció, es visualitzen bandes de 105 i/o 117 parells de bases, que es corresponen a les insercions de 6 i 18 nucleòtids respectivament.

IV.3. SEQÜENCIACIÓ DE LES BANDES AMPLIFICADES PER PCR.

Les bandes amplifiades per PCR són confirmades per seqüenciació. Cada una de les bandes que es vol seqüenciar es retalla del gel d'acrilamida-bisacrilamida, es posa sobre un tros de paper Watmann, i es deshidrata a 80°C durant 1 hora en un assecador de gels. El DNA present en les bandes és eluït en 120 µl de TE a 37°C durant 1 hora. Es realitza una amplificació del fragment per PCR amb els mateixos *primers* i en les mateixes condicions d'amplificació. Els fragments amplifiats es sotmeten a electroforesi en gels d'agarosa al 2%, que són tenyits amb bromur d'etidi i visualitzats amb un transiluminador de llum ultraviolada. Les bandes amplifiades són retallades i purifiades amb el Kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Posteriorment es confirmen els resultats mitjançant la reacció de seqüència de cada una de les bandes amplifiades.

V. TRANSFECCIÓ DE CÈL·LULES JURKAT.

V.1. OBTENCIÓ DELS PLÀSMIDS.

Durant el desenvolupament de la Tesi, s'han utilitzat diferents plàsmids, tant d'expressió de proteïnes, com és el cas dels plàsmids utilitzats per normalitzar la quantitat de cèl·lules transfectades, com plàsmids que portaven diferents promotors dels gens d'estudi davant del gen *reporter* de la luciferasa. Alguns d'aquests plàsmids han estat sintetitzats al nostre laboratori, mentre que d'altres han estat cedits per diferents grups amb els què hem col·laborat (Taula-M5).

L'obtenció de grans quantitats de plàsmid es fa mitjançant la transformació de bacteries competents (*E. coli* de la soca DH5 α) per la tècnica del xoc tèrmic (seguint el protocol de Manniatis). La purificació dels plàsmids es realitza amb *kits* comercials de Maxiprep, seguint les instruccions dels diferents fabricants. La quantificació de les concentracions i la puresa a la què es troben les diferents construccions es realitza mesurant l'absorbància a 260 nm per espectrofotometria, i el posterior anàlisi en gels d'agarosa al 1%.

Plàsmid	Construcció
pACC	Conté el promotor de l'Acetil CoA carboxilasa.
pBcl-2g	Conté els dos promotors del gen <i>bcl-2</i> davant del gen de la luciferasa.
pBcl-2p	Conté només un promotor del gen <i>bcl-2</i> davant del gen de la luciferasa.
pBcl-X	Conté el promotor del gen <i>bcl-X</i> davant del gen de la luciferasa.
pCMV	Promotor constituït del citomegalovirus davant del gen de la luciferasa.
pcDNA3	Vector d'expressió buit.
pEGFPN-1	Vector d'expressió per la <i>Green Fluorescent Protein</i> , sota el promotor constituït del citomegalovirus.
pFAS	Conté el promotor de la sintetasa d'àcids grassos davant del gen de la luciferasa.
pGL2-Basic	Vector que permet clonar diferents promotors dels gens d'interès davant del gen de la Luciferasa.
pMcl-1	Promotor del gen <i>mcl-1</i> davant del gen de la Luciferasa.
XIAP	Vector que porta la regió 5'-UTR d'XIAP (des de -3999 a -5) davant del gen de la luciferasa.

TAULA-M5. Principals construccions utilitzades en les transfeccions.

V.2. ASSAIG DE TRANSFECCIÓ.

Per tal de sobreexpressar transitòriament les proteïnes d'interès, o bé les proteïnes *reporters* sota control dels promotors d'estudi en les cèl·lules Jurkat, es transfecten les cèl·lules mitjançant la tècnica d'electroporació:

- Per cada condició d'electroporació calen 10×10^6 cèl·lules Jurkat en fase logarítmica de creixement.
- Les cèl·lules es renten amb RPMI i es resuspenen amb 650 μ l de medi complet sense antibiòtics.
- Afegir els plàsmids a la suspensió de cèl·lules: 2 μ g del plàsmid *reporter* (pEGFPN-1) i 8-10 μ g del plàsmid d'interès (o pGL2-Basic com a control). Totes les electroporacions cal fer-les amb igual quantitat de plàsmid.
- Electroporació amb cubetes de 0,4 cm de pas, a un voltatge de 250 V i una capacítància de 975 μ F, utilitzant un electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX Inc).
- Després de la descàrrega de l'electroporador, les cèl·lules es dilueixen ràpidament en medi de cultiu complet i es deixen a l'incubador.
- Passades 24 hores, les cèl·lules electroporades es poden sotmetre als diferents tractaments.
- Recollida de les cèl·lules per obtenir els extractes proteics i analitzar els nivells d'expressió d'activitat luciferasa en un luminòmetre. Cal agafar una alíquota per analitzar els nivells d'expressió del plàsmid *reporter* pEGFPN-1 per citometria de flux, per saber el tant per cert de cèl·lules electroporades, i una alíquota per quantificar la quantitat de proteïna total de cada una de les mostres. Els resultats del luminòmetre s'expressen en funció del percentatge de cèl·lules electroporades i dels nivells proteics de cada mostra.

VI. APÈNDIX. PRINCIPALS REACTIUS I DROGUES UTILITZATS.

A la Taula-M6 s'indiquen els principals reactius utilitzats i la casa comercial.

PRODUCTE	PROVEÏDOR	PRODUCTE	PROVEÏDOR
Actinomicina D	SIGMA	Ficoll/Hypaque	Seromed
anexina V-FITC	Bender Medsystems	IL-4	R&D Systems
anti-CD19-PE	Becton Dickinson	Iodur de propidi	SIGMA
anti-CD3-APC	Becton Dickinson	Ionomicina	Calbiochem
Aspirina	SIGMA	LLNL	SIGMA
Bisl	Calbiochem	LY294002	Calbiochem
Cicloheximida	SIGMA	MG132	SIGMA
Dexametasona	Merck	RPMI 1640	Biological Industries
DMSO	SIGMA	TPA	SIGMA
Estaurosporina	SIGMA	U0126	Calbiochem
FBS (sèrum)	Gibco BRL	Z-VAD.fmk	Bachem

TAULA-M6. Principals reactius comercials i proveïdors.

L'aspirina es prepara en forma de solució a 100 mg/ml en etanol 96%. Cal neutralitzar la solució fins a pH de 7 amb NaOH 4 M (per cada 100 mg d'aspirina, cal afegir aproximadament 840 µl d'etanol 96% i 160 µl de NaOH 4 M, i cal comprovar sempre que el pH final és de 7). Es pot guardar a 4°C tapada de la llum, on és estable durant una setmana.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA**A**

Abrams, M.T., Robertson, N.M., Yoon, K., Wickstrom, E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem*, 279(53):55809-17; 2004.

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, 9, 423-32; 2002.

Adachi, M., Tefferi, A., Greipp, P.R., Kipps, T.J., Tsujimoto, Y. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.*, 171(2):559-564; 1990.

Adachi, M., Zhao, X., Imai, K. Nomenclature of dynein light chain-linked BH3-only protein Bim isoforms. *Cell Death Differ.*, 12(2):192-193; 2005.

Adams, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes and Development*, 17: 2481-2495; 2003.

Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chan, T.O., Tschlis, P.N. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *PNAS*, 94, 3627-3632; 1997.

Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R., Edwards, S.W. Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell Mol Life Sci.*, 57(4):684-691; 2000.

Akiyama, T., Bouillet, P., Miyazaki, T., Kadono, Y., Chikuda, H., Chung, U.I., Fukuda, A., Hikita, A., Seto, H., Okada, T., Inaba, T., Sanjay, A., Baron, R., Kawaguchi, H., Oda, H., Nakamura, K., Strasser, A., Tanaka, S. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J.*, 22(24):6653-6664; 2003.

Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403 (6769):503-511; 2000.

Altmeyer, A., Simmons, R.C., Krajewski, S., Reed, J.C., Bornkamm, G.W., Chen-Kiang, S. Reversal of EBV immortalization precedes apoptosis in IL-6-induced human B cell terminal differentiation. *Immunity*, 7, 667-677; 1997.

Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.*, 3(8):917-921; 1997.

An, W.G., Hwang, S.G., Trepel, J.B., Blagosklonny, M.V. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*, 14(7):1276-1283; 2000.

Andritsos, L. i Khoury, H. Chronic lymphocytic leukemia Current Treatment Options in *Oncology*, 3, 225-231; 2002.

Ashkenazi, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews in Cancer*, 2, 420-430; 2002.

B

Bachmann, P.S., Gorman, R., Mackenzie, K.L., Lutze-Mann, L., Lock, R.B. Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. *Blood*. Nov 30; 2004.

Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem*, 18;275(33): 25255-25261; 2000.

Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K. & Barber, G.N. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signalling. *EMBO J.* 17, 6888-6902; 1998.

Bannerman, D.D., Tupper, J.C., Ricketts, W.A., Bennett, C.F., Winn, R.K., Harlan, J.M. A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, 276(18):14924-14932; 2001.

Barragán, M. Tesi doctoral: Transducción de señales en la supervivencia de las células de leucemia linfática crónica de células B. Universitat de Barcelona; 2002.

BIBLIOGRAFIA

- Barragán, M., Bellosillo, B., Campàs, C., Colomer, D., Pons, G., Gil, J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 99, 2969-2976; 2002.
- Barragán, M., Campàs, C., Bellosillo, B., Gil, J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 44, 1865-1870; 2003.
- Battle, T.E. i Frank, D.A. The role of STATs in apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 2, 381-392; 2002.
- Bellosillo, B., Dalmau, M., Colomer, D., Gil, J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89, 3378-3384; 1997.
- Bellosillo, B., Pique, M., Barragan, M., Castano, E., Villamor, N., Colomer, D., Montserrat, E., Pons, G., Gil, J. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 92, 1406-1414; 1998.
- Bernal, A., Pastore, R.D., Asgary, Z., Keller, S.A., Cesarman, E., Liou, H.C., Schattner, E.J. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 98, 3050-3057; 2001.
- Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R.R., Croce, C.M. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *PNAS*, 99, 6955-6960; 2002.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J. i col. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48 (1):198-206; 1981.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., Whyte, M.K. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem.*, 275(29):22136-22146; 2000.
- Biswas, S.C. i Greene, L.A. Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem*, 20;277(51):49511-6; 2002.
- Bott, C.M., Doshi, J.B., Li, L.L., McMurtry, S.A., Sanders, J.L. & Fox, D.A. Transcriptional regulation of CD6 expression on human T lymphocytes by phorbol ester. *J. Immunol.* 153, 1-9; 1994.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C.S., Tarlinton, D.M., Kay, T.W.H., Köntgen, F., Adams, J.M., i Strasser, A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286: 1735-1738; 1999.
- Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L.C., Strasser, A., Adams, J.M. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell*, 1, 645-653; 2001.
- Bouillet, P. i Strasser, A. BH3-only proteins - Evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.* 115: 1567-1574; 2002.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415: 922-926; 2002.
- Bounpheng, M.A., Dimas, J.J., Dodds, S.G., Christy, BA. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.*, 13(15):2257-2264; 1999.
- Böyum, A. Separation of white blood cells. *Nature*, 204:793-4; 1964.
- Brazil, D.P. i Hemmings, B.A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 657-664; 2001.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22, 8608-8618; 2003.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71-94; 1974.
- Brophy, V.A., Tavaré, J.M., Rivett, A.J. Treatment of COS-7 cells with proteasome inhibitors or gamma-interferon reduces the increase in caspase 3 activity associated with staurosporine-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys.*, 397(2):199-205; 2002.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96, 857-868; 1999.

Bullrich, F., Veronese, M.L., Kitada, S., Jurlander, J., Caligiuri, M.A., Reed, J.C. i col. Minimal region of loss at 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 88 (8):3109-3115; 1996.

Bullrich, F., Rasio, D., Kitada, S., Starostik, P., Kipps, T., Keating, M. i col. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.*, 59 (1):24-27; 1999.

Burger, J.A., Burger, M., Kipps, T.J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94(11):3658-3667; 1999.

Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., Kipps, T.J. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96 (8):2655-2663; 2000.

Bushell, M., McKendrick, L., Jänicke, R.U., Clemens, M.J., Morley, S.J. Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett.* 451, 332-336; 1999.

Bushell, M., Wood, W., Clemens, M.J., Morley, S.J. Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur J Biochem.*, 267(4):1083-1091; 2000

Byrd, J.C., Shinn, C., Waselenko, J.K., Fuchs, E.J., Lehman, T.A., Nguyen, P.L., Flinn, I.W., Diehl, L.F., Sausville, E., Grever, M.R. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood*, 92, 3804-3816; 1998.

Byrd, J.C., Kitada, S., Flinn, I.W., Aron, J.L., Pearson, M., Lucas, D., Reed, J.C. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 99, 1038-1043; 2002.

Byrd, J.C., Peterson, B.L., Morrison, V.A., Park, K., Jacobson, R., Hoke, E., Vardiman, J.W., Rai, K., Schiffer, C.A., Larson, R.A. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 101, 6-14; 2003.

C

Campàs, C., Lopez, J.M., Santidrian, A.F., Barragan, M., Bellosillo, B., Colomer, D., Gil, J. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood*, 101(9):3674-3680; 2003.

Campàs, C., Tesi doctoral: Bases moleculars de la teràpia de la leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B. Recerca de nous agents inductors d'apoptosi. Universitat de Barcelona; 2004.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-1321; 1998..

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, 104(5):769-780; 2001.

Chao, J.R., Wang, J.M., Lee, S.F., Peng, H.W., Lin, Y.H., Chou, C.H., Li, J.C., Huang, H.M., Chou, C.K., Kuo, M.L., Yen, J.Y., Yang-Yen, H.F. Mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signalling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4883-4898; 1998.

Chen, D., Wang, M., Zhou, S., Zhou, Q. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J*, 21(24):6801-6810; 2002a.

Chen, D. i Zhou, Q. Caspase cleavage of BimEL triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3;101(5):1235-40; 2004a.

Chen, J.Z., Ji, C.N., Gu, S.H., Li, J.X., Zhao, E.P., Huang, Y., Huang, L., Ying, K., Xie, Y., Mao, Y.M. Over-expression of Bim alpha3, a novel isoform of human Bim, result in cell apoptosis. *Int.J. Biochem. Cell. Biol.* 36(8):1554-61; 2004b.

Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., Kipps, T.J. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(13):4609-4614; 2002b.

Chen, L., Apgar, J., Huynh, L., Dicker, F., Giago-McGahan, T., Rassenti, L., Weiss, A., Kipps, T.J. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 105(5):2036-2041; 2005a.

BIBLIOGRAFIA

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D.C. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol. Cell.*, 17(3):393-403; 2005b.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., Korsmeyer, S.J. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8(3):705-711; 2001.

Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O'Brien, S. i col. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87 (12):4990-4997; 1996.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-1014; 2004.

Clemens, M.J., Bushell, M., Morley, S.J. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene*. 17, 2921-2931; 1998.

Clemens, M.J., Bushell, M., Jeffrey, I.W., Pain, V.M., Morley, S.J. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell. Death. Differ.* 7, 603-615; 2000.

Clohessy, J.G., Zhuang, J., Brady, H.J. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol.*, 125(5):655-665; 2004.

Corcione, A., Pistoia, V. B-cell-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Methods*, 11(1):143-147; 1997.

Cory, S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol.*, 13:513-543; 1995.

Cory, S. i Adams, J.M. The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2: 647-656; 2002.

Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22, 8590-8607; 2003.

Craig, R.W. The bcl-2 gene family, .*Semin Cancer Biol.*, 6(1):35-43, 1995.

Craig, R.W. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*,16, 444-454; 2002.

Craven, P.A. i DeRubertis, F.R.. Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 13(4):541-546; 1992.

Croxton, R., Ma, Y., Cress, W.D. Differences in DNA binding properties between E2F1 and E2F4 specify repression of the Mcl-1 promoter. *Oncogene*, 21(10):1563-1570; 2002.

Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., White, E. DNA damage response and Mcl-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes and Development*, 17: 2922-2932; 2003.

D

Dameshek, W. Chronic lymphocytic leukemia: an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 29, 566-584; 1967.

Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., Bron, D., Delespesse, G., Sarfati, M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J.Exp.Med.*, 176 (5):1319-1326; 1992.

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., Gygi, S.P., Korsmeyer, S.J. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 424(6951):952-956; 2003.

Danial, N.N. i Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219; 2004.

Darnell, J.E. Jr. STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635, 1997.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241; 1997.

Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and Development* 13, 2905-2927; 1999.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689; 1997.

Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R., Amiot, M. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, 100(1):194-199; 2002.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., Martinou, J.C. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell.*, 8(3):601-611, 2001.

Desai, R.K., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., Lian, J.B. Control of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor-mediated enhancement of osteocalcin gene transcription: effects of perturbing phosphorylation pathways by okadaic acid and staurosporine. *Endocrinology*. 136, 5685-5693; 1995.

Dever, T.E. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 108, 545-556; 2002.

Deveraux, Q.L. i Reed, J.C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis, *Genes & Development*, 13, 239-252; 1999.

Dijkers, P.F., Medemadagger, R.H., Lammers, J.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.*, 10, 1201-1204; 2000.

Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., Coffey, P.J. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J. Cell Biol.*, 156, 531-542; 2002.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Fischer, K., Bentz, M., Lichter, P. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes. *Leukemia*, 11 Suppl 2:S19-24. S19-S24; 1997.

Domina, A.M., Smith, J.H., Craig, R.W. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem.*, 275(28):21688-21694; 2000.

Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., Craig, R.W. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*, 23(31):5301-5315; 2004.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1):33-42; 2000.

Dumas, E., Staedel, C., Colombat, M., Reigadas, S., Chabas, S., Astier-Gin, T., Cahour, A., Litvak, S., Ventura, M. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR. *Nucleic Acids Res.*, 31(4):1275-1281; 2003.

Durocher, D. i Jackson, S.P. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Current opinion in Cell Biology* 13, 225-231; 2001.

E

Eden, E. i Brunak, S. Analysis and recognition of 5' UTR intron splice sites in human pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 32(3):1131-1142; 2004.

Edwards, S.W., Derouet, M., Howse, M., Moots, R.J. Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem Soc Trans.*, 32(Pt3):489-492; 2004.

Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., Cory, S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 20;101(16):6164-6169; 2004a.

Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L., Cory, S. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood*, 103(6):2276-2283; 2004b.

Ellis, H.M. i Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-829; 1986.

BIBLIOGRAFIA

Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M., Strasser, A. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med*, 198(7):1119-1126; 2003.

Erdos, G. i Lee, Y.J. Effect of staurosporine on the transcription of HSP70 heat shock gene in HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 476-483; 1994.

F

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.*, 148 (7):2207-2216; 1992.

Fenau, P., Preudhomme, C., Lai, J.L., Quiquandon, I., Jonveaux, P., Vanrumbeke, M. i col. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia*, 6 (4):246-250; 1992.

Ferri, K.F. i Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3: E255-E263; 2001.

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

Fong, W.G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., Korneluk, R.G. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, 70(1):113-122; 2000.

Forbes, I.J. i Zalewski, P.D. A subpopulation of human B lymphocytes that rosette with mouse erythrocytes. *Clin.Exp.Immunol.*, 26 (1):99-107; 1976.

Forbes, I.J., Zalewski, P.D., Giannakis, C., Cowled, P.A. Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Experimental Cell Research* 198, 367-372; 1992.

Frank, D.A., Mahajan, S., Ritz, J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *Journal of Clinical Investigation* 100, 3140-3148; 1997.

Franklin, R.A. i McCubrey, J.A. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 14, 2019-2034; 2000.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., Yeh, E.T. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.*, 275(50):39458-39465; 2000.

Furman, R.R., Asgary, Z., Mascarenhas, J.O., Liou, H.C., Schattner, E.J. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Immunology* 164, 2200-2206; 2000.

G

Galton, D.A. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canadian Medical Association Journal* 94, 1005-1010; 1966.

Gerlitz, G., Jagus, R., Elroy-Stein, O. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem.*, 269(11):2810-2819; 2002.

Gilley, J., Coffey, P.J., Ham, J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, 162(4):613-622; 2003.

Gomez-Bougie, P., Bataille, R., Amiot, M. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol.*, 34(11):3156-3164; 2004.

Gomez-Bougie, P., Bataille, R., Amiot, M. Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-x(L) and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. *Eur J Immunol.*, 35(3):971-976; 2005.

Green, D.R. i Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1311; 1998.

Grever, M.R. In pursuit of a complete remission: exploring novel therapeutic agents in CLL. *Blood* 101 (7), 2449; 2003.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., Hickman, J.A. Cell damage-induced conformational changes of the proapoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144: 903-914; 1999.

Grumont, R.J., Rourke, I.J., Gerondakis, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13(4):400-411; 1999.

H

Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K., Hatakeyama, S. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med.*, 188(11):1985-1992; 1998.

Han, B. i Zhang, J.T. Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *Mol Cell Biol.*, 22(21):7372-7384; 2002.

Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu, L., Chittenden, T. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci.*, 98(20):11318-11323; 2001.

Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Froelich, C.J., Yin, X.M., Rabinowich, H. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *J Biol Chem.*, 279(21):22020-9; 2004.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., Reed, J.C. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82 (6):1820-1828; 1993.

Hanada, M., Saito, E., Kambe, T., Hagiwara, Y., Kubo, T. Effects of genistein and staurosporine on angiotensin II-induced DNA synthesis, protein synthesis and mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 1045-1049; 1998.

Hausmann, G., O'Reilly, L.A., van Driel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M., Huang, D.C.S. Proapoptotic apoptosis protease-activating Factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-xL. *J. Cell Biol.* 149: 623-634; 2000.

Hengartner, M.O. i Horvitz H.R. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 76, 665-676; 1994.

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776; 2000.

Hennino, A., Berard, M., Krammer, P.H., Defrance, T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *Journal Experimental Medicine*, 193, 447-458; 2001.

Herrant, M., Luciano, F., Loubat, A., Auberger, P. The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. *Transcriptional and postranscriptional regulation. Oncogene*, 21(32):4957-4968; 2002.

Herrant, M., Jacquet, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., Auberger, P. Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(47):7863-73; 2004.

Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., Korneluk, R.G. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nature Cell Biol.* 1, 190-192; 1999.

Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R.G., Chow, T. Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*. 19, 4174-4177; 2000.

Holcik, M., Gordon, B.W., Korneluk, R.G. The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol Cell Biol.*, 23(1):280-288; 2003.

Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59: 1701s-1706s; 1999.

Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 3668-3672; 1997.

Hsu, Y.T. i Youle, R.J. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 273: 10777-10783; 1998.

Huang, P., Sandoval, A., Van Den Neste, E., Keating, M.J., Plunkett, W. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia* 14, 1405-1413; 2000.

I

Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., Ichijo, H. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem.*, 277(46):43730-43734; 2002.

J

Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., McKinnon, P.J., Cleveland, J.L., Zambetti, G.P. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321-328; 2003.

Jennings, C.D. i Foon, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90, 2863-2892; 1997.

Johnson, A.J., Mone, A.P., Abhyankar, V., Byrd, J.C. Advances in the therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion Haematology*, 10, 297-305; 2003.

Johnston, J.B., Paul, J.T., Neufeld, N.J., Haney, N., Kropp, D.M., Hu, X., Cheang, M., Gibson, S.B. Role of myeloid cell factor-1 (Mcl-1) in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 45(10):2017-2027; 2004.

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

Jones, G.G., Reaper, P.M., Pettitt, A.R., Sherrington, P.D. The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes. *Oncogene*, 23, 1911-1921; 2004.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828):549-554; 2001.

K

Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahashi, T., Noda, T., Kitamura, Y., Kondoh, H., Tsujimoto, Y. bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.*, 55(2):354-359; 1995.

Kapanadze, B., Makeeva, N., Corcoran, M., Jareborg, N., Hammarsund, M., Baranova, A. i col. Comparative sequence analysis of a region on human chromosome 13q14, frequently deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, and its homologous region on mouse chromosome 14. *Genomics*, 70 (3):327-334; 2000.

Karin, M. i Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 3, 221-227; 2002.

Kasai, T., Ohguchi, K., Nakashima, S., Ito, Y., Naganawa, T., Kondo, N., Nozawa, Y. Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 161, 6469-6474; 1998.

Kasof, G.M. i Gomes, B.C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem.*, 276(5):3238-3246; 2001.

Kawauchi, K., Ogasawara, T., Yasuyama, M. Activation of extracellular signal-regulated kinase through B-cell antigen receptor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Hematology* 75, 508-513; 2002.

Keating, M.J., Chiorazzi, N., Messmer, B., Damle, R.N., Allen, S.L., Rai, K.R., Ferrarini, M., Kipps, T.J. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 153-175; 2003.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257; 1972.

Kipps, T.J. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinions in Haematology* 10, 312-318; 2003.

Kirschnek, S., Ying, S., Fischer, S.F., Hacker, H., Villunger, A., Hochrein, H., Hacker, G. Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol*, 174(2):671-679; 2005.

Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., Rai, K., Hines, J., Reed, J.C. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91, 3379-3389; 1998.

Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M., Reed, J.C. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 106, 995-1004; 1999.

Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M., Reed, J.C. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96, 393-397; 2000.

Kitada, S., Pedersen, I.M., Schimmer, A.D., Reed, J.C. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*, 21, 3459-3474; 2002.

Kitada, S. i Reed, J.C. MCL-1 promoter insertions dial-up aggressiveness of chronic leukemia. *J Natl Cancer Inst.*, 96(9):642-643; 2004.

Klampfer, L., Cammenga, J., Wisniewski, H-G., Nimer, S.D. Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. *Blood*. 93, 2386-2394; 1999.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H. i col. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J.Exp.Med.*, 194 (11):1625-1638; 2001.

Komar, A.A. i Hatzoglou, M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: The mystery of their existence. *J Biol Chem.*, Mar 4; 2005.

Kontny, U., Barrachina, C., Habermehl, P., Mannhardt, W., Zepp, F., Schofer, O. Distribution of lymphocyte surface antigens in healthy neonates. *Eur.J.Pediatr.*, 153 (4):257-259; 1994.

Kozak, M. New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol Cell Biol.*, 21(6):1899-1907; 2001.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig, R.W. Mcl-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 3516-3520; 1993.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, 53(19):4701-4714; 1993.

Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M., Reed, J.C. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol.*, 145(3):515-525; 1994.

Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., Reed, J.C. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol.*, 146(6):1309-1319 ; 1995.

Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, 94, 325-337; 1998.

Kune, G.A., Kune, S., Watson, L.F.. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.*, 48(15):4399-4404; 1988.

Kuribara, R., Honda, H., Matsui, H., Shinjyo, T., Inukai, T., Sugita, K., Nakazawa, S., Hirai, H., Ozawa, K., Inaba, T. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, 24(14):6172-6183 ; 2004.

Kwon, G., Hill, J.R., Corbett, J.A., McDaniel, M.L. Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINm5F cells and rat islets. *Mol Pharmacol.*, 52(3):398-405 ; 1997.

L

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (259):680-685; 1970.

Lagace, M., Xuan, J.Y., Young, S.S., McRoberts, C., Maier, J., Rajcan-Separovic, E., Korneluk, R.G. Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics*, 77(3):181-188 ; 2001.

Lee, R., i Collins, T. Nuclear factor-kappaB and cell survival: IAPs call for support. *Circ Res.*, 88(3):262-264 ; 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Leo, C.P., Hsy, S.Y., Chun, S-Y., Bae, H-W., Hsue, A.J.W. Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukaemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. *Endocrinology*, 140, 5469-5477; 1999.
- Lerner, A., Kim, D.H., Lee, R. The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leukemia and Lymphoma* 37, 39-51; 2000.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biology*, 6, 443-450; 2004.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., Cook, S.J. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem*, 278(21):18811-18816; 2003.
- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., Howes, E., Balmanno, K., Cook, S.J. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. *J Biol Chem*, 279(10):8837-8847; 2004.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Altieri, D.C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396(6711):580-584; 1998a.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.-J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501; 1998b.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., Williams, R.S. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 101, 389-399; 2000.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99; 2001.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A., Korneluk, R.G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379(6563):349-353; 1996.
- Liston, P., Fong, W.G., Kelly, N.L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C.G., McBurney, M.W., Korneluk, R.G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol.*, 3(2):128-133; 2001.
- Liston, P., Fong, W.G., Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, 22, 8568-8580; 2003.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., Strasser, A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.*, 5(4):411-417; 1994.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1):147-157; 1996.
- Lomo, J., Smeland, E.B., Krajewski, S., Reed, J.C., Blomhoff, H.K. Expression of the Bcl-2 homologue Mcl-1 correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Res.* 56, 40-43 ; 1996.
- Luciano, F., Jacquet, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., Auberger, P. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*, 2;22(43):6785-93 ; 2003.

M

- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., Lemoine, N.R. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3577-3589; 2002.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16202-16212; 2000.
- Marsden, V.S. i Strasser, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 71-105; 2003.
- Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Lopez-Royuela, N., Gomez-Benito, M., Larrad, L., Lasiera, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., Naval, J. Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 18(10):1599-604; 2004.

- Mavromatis, B.H. i Cheson, B.D. Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Blood Reviews* 18, 137-148; 2004.
- McConkey, D.J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P., Eriksson, I., Mellstedt, H., Orrenius, S., Jondal, M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Journal of Immunology* 146, 1072-1076; 1991.
- Mellor, H. i Parker P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal* 332, 281-292; 1998.
- Mentz, F., Merle-Beral, H., Dalloul, A.H. Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production. *Leukemia* 13, 78-84; 1999.
- Merino, R., Ding, L., Veis, D.J., Korsmeyer, S.J., Nuñez, G. Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J.* 13, 683-691; 1994.
- Michels, J., Johnson, P.W., Packham, G. Mcl-1. *Inter. J. Bioche. Cell biol.*, 37: 267-271; 2005.
- Migliazza, A., Bosch, F., Komatsu, H., Cayanis, E., Martinotti, S., Toniato, E. i col. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97 (7):2098-2104; 2001.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., Moll, U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* 11, 577-590; 2003.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y., Greaves, M.F. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem.*, 40(12):1819-1825; 1992.
- Montserrat, E. i Rozman, C. Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Annual Oncology* 6, 219-235; 1995.
- Montserrat, E. New therapeutic issues in CLL. *Hematological Cell Therapy*, 39 Suppl , S45-49 ; 1997.
- Moon, E., Lee, R., Near, R., Weintraub, L., Wolda, S., Lerner, A. Inhibition of PDE3B augments PDE4 inhibitor-induced apoptosis in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research* 8, 589-595; 2002.
- Morales, A.A., Olsson, A., Celsing, F., Osterborg, A., Jondal, M., Osorio, L.M. Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 18(1):41-47; 2004.
- Morley, S.J., Jeffrey, I., Bushell, M., Pain, V.M., Clemens, M.J. Differential requirements for caspase-8 activity in the mechanism of phosphorylation of eIF2 α , cleavage of eIF4GI and signalling events associated with the inhibition of protein synthesis in apoptotic Jurkat T cells. *FEBS Lett.* 477, 229-236; 2000.
- Morley, S.J. i Pain, V.M. Proteasome inhibitors and immunosuppressive drugs promote the cleavage of eIF4GI and eIF4GII by caspase-8-independent mechanisms in Jurkat T cell lines. *FEBS Lett.*, 503(2-3):206-212; 2001.
- Moshynska, O., Sankaran, K., Pahwa, P., Saxena, A.. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst.*, 96(9):673-682; 2004.
- Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., Nakano, T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med.*, 189(11):1691-1698; 1999.
- Mouhamad, S., Besnault, L., Auffredou, M.T., Leprince, C., Bourgeade, M.F., Leca, G., Vazquez, A. B cell receptor-mediated apoptosis of human lymphocytes is associated with a new regulatory pathway of Bim isoform expression. *J Immunol*, 172(4):2084-2091; 2004.
- Munzert, G., Kirchner, D., Stobbe, H., Bergmann, L., Schmid, R.M., Dohner, H., Heimpel, H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 100, 3749-3756; 2002.
- N**
- Nakano, K. i Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 7(3):683-694; 2001.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F.W., et al. Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science*, 261(5128):1584-1588; 1993.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., Loh, D.Y. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(9):3700-3704; 1994.

BIBLIOGRAFIA

Newcomb, E.W. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leuk.Lymphoma*, 17 (3-4):211-221; 1995.

Nicholson, D.W. i Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.*, 22 (8):299-306; 1997.

Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6:1028-42; 1999.

Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., Wang, X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development*, 17, 1475-1486; 2003.

Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates proapoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 278: 2058-2065; 2003.

O

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., Huang, D.C.S. Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17: 384-395; 1998.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468):1053-1058; 2000.

O'Gorman, D.M. i Cotter, T.G. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia* 15, 21-34; 2001.

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

Opferman, J.T., Iwasaki, H., Ong, C.C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., Korsmeyer, S.J. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, 307(5712):1101-1104; 2005.

Oscier, D.G., Thompsett, A., Zhu, D., Stevenson, F.K. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*, 89 (11):4153-4160; 1997.

Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., Glide, S., Davis, Z.A., Ibbotson, R.E., Corcoran, M.M., Chapman, R.M., Thomas, P.W., Copplestone, J.A., Orchard, J.A., Hamblin, T.J. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100, 1177-1184; 2002.

Oscier, D., Fegan, C., Hillmen, P., Illidge, T., Johnson, S., Maguire, P., Matutes, E., Milligan, D. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 125, 294-317; 2004.

Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85; 1999.

P

Panayiotidis, P., Ganeshaguru, ., Jabbar, S.A., Hoffbrand, A.V. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br.J.Haematol.*, 85 (3):439-445; 1993.

Pangalis, G.A., Vassilakopoulos, T.P., Dimopoulou, M.N., Siakantaris, M.P., Kontopidou, F.N., Angelopoulou, M.K. B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematological Oncology* 20, 103-146; 2002.

Parker, B.W., Kaur, G., Nieves-Neira, W., Taimi, M., Kohlhagen, G., Shimizu, T., Losiewicz, M.D., Pommier, Y., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M. Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood* 91, 458-465; 1998.

Pedersen, I.M., Buhl, A.M., Klausen, P., Geisler, C.H., Jurlander, J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99, 1314-1319; 2002.

Pepper, C., Thomas, A., Hoy, T., Fegan, C., Bentley, P. Flavopiridol circumvents Bcl-2 family mediated inhibition of apoptosis and drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British of Journal Haematology*, 114, 70-77; 2001.

Pepper, C., Thomas, A., Hoy, T., Milligan, D., Bentley, P., Fegan, C. The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood*, 101, 2454-2460; 2003.

Pettitt, A.R., Sherrington, P.D., Stewart, G., Cawley, J.C., Taylor, A.M., Stankovic, T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 98, 814-822; 2001.

Pettitt, A.R. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 121, 692-702; 2003.

Piqué, M. Tesi Doctoral. Estudi del mecanisme d'inducció d'apoptosi per aspirina i salicilat en cèl·lules leucèmiques. Universitat de Barcelona; 2000.

Piqué, M., Barragán, M., Dalmau, M., Bellosillo, B., Pons, G., Gil, J. Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett.*, 480 (2-3):193-196; 2000.

Piret, J.P., Minet, E., Cosse, J.P., Ninane, N., Debacq, C., Raes, M., Michiels, C. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Overexpression of Myeloid Cell Factor-1 Protects Hypoxic Cells against tert-Butyl Hydroperoxide-induced Apoptosis. *J Biol Chem.*, 280(10):9336-9344; 2005.

Polliack, A. Current therapeutic options for subgroups of chronic lymphocytic leukemia. Planning risk-adapted treatment according to recognized prognostic factors. *Haematologica* 88, 726-728; 2003.

Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Kontgen, F., Adams, J.M., Cory, S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(21):12424-12431; 1998.

Putchá, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.M., Strasser, A., Johnson, E.M.J. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, 29, 615-628; 2001.

Puthalakath, H., Huang, D.C.S., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3: 287-296; 1999.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C.S., Strasser, A. Bim: A proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293: 1829-1832; 2001.

Puthalakath, H. i Strasser, A. Keeping killers on a tight leash: Transcriptional and posttranslational control of the proapoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9: 505-512; 2002.

R

Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46:219-234; 1975.

Rai, K. i Hallek, M. Future prospects for alemtuzumab (MabCampath). *Medical Oncology* 19, S57-S63; 2002.

Ranganathan, G., Kaakaji, R., Kern, P.A. Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 9122-9127; 1999.

Ranger, A.M., Malynn, B.A., Korsmeyer, S.J. Mouse models of cell death. *Nat Genet.*, 28(2):113-118; 2001.

Ranger, A.M., Zha, J., Harada, H., Datta, S.R., Danial, N.N., Gilmore, A.P., Kutok, J.L., Le Beau, M.M., Greenberg, M.E., Korsmeyer, S.J. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(16):9324-9329; 2003.

Rathmell, J.C., Lindsten, T., Zong, W.-X., Cinalli, R.M., Thompson, C.B. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat. Immunol.* 3: 932-939; 2002.

Reddy, B.S., Rao, C.V., Rivenson, A., Kelloff, G. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis*, 14(8):1493-1497; 1993.

Reed, J.C. A day in the life of the Bcl-2 protein: does the turnover rate of Bcl-2 serve as a biological clock for cellular lifespan regulation? *Leuk. Res.* 20, 109-111; 1996.

Reed, J.C. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin.Oncol.*, 25 (1):11-18; 1998.

Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., Brugge, J.S. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol.*, 5(8):733-740; 2003.

BIBLIOGRAFIA

Richter, B.W., Mir, S.S., Eiben, L.J., Lewis, J., Reffey, S.B., Frattini, A., Tian, L., Frank, S., Youle, R.J., Nelson, D.L., Notarangelo, L.D., Vezzoni, P., Fearnhead, H.O., Duckett, C.S. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol.*, 21(13):4292-4301; 2001.

Rigaut, K.D., Gao, Y., Lenard, J. Effects of staurosporine on transcription by vesicular stomatitis virus. *Virology.* 194, 433-440; 1993.

Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C., Decker, T. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 100, 3741-3748; 2002.

Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., Korsmeyer, S.J. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes & Dev.*, 14, 23-27; 2000.

Robertson, L.E., Chubb, S., Meyn, R.E., Story, M., Ford, R., Hittelman, W.N., Plunkett, W. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 81, 143-150; 1993.

Rodriguez, J. i Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev.* 13: 3179-3184; 1999.

Rosas, M., Birkenkamp, K.U., Lammers, J.W., Koenderman, L., Coffey, P.J. Cytokine mediated suppression of TF-1 apoptosis requires PI3K activation and inhibition of Bim expression. *FEBS Lett*, 579(1):191-198; 2005.

Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X. i col. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J.Exp.Med.*, 194 (11):1639-1647; 2001.

Ross, A.J., Waymire, K.G., Moss, J.E., Parlow, A.F., Skinner, M.K., Russell, L.D., MacGregor, G.R. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet.*, 18(3):251-256; 1998.

Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shuttler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* Jan 13;80(1):167-178; 1995.

Rozman, C. i Montserrat, E. Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* 333, 1052-1057; 1995.

S

Saelens, X., Kalai, M., Vandenaabeele, P. Translation inhibition in apoptosis. Caspase-dependent PKR activation and eIF2 α phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 41620-41628; 2001.

Safer, B. 2B or not 2B: regulation of the catalytic utilization of eIF-2. *Cell.* 33, 7-8; 1983.

Salar, A., Fernandez de Sevilla, A., Romagosa, V., Domingo-Claros, A., Gonzalez-Barca, E., de Sanjose, S., Pera, J., Servitje, O., Granena, A. Distribution and incidence rates of lymphoid neoplasms according to the REAL classification in a single institution. A prospective study of 940 cases. *European Journal of Haematology*, 59, 231-237; 1997.

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

Sampath, D., Rao, V.A., Plunkett, W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 22, 9063-9074; 2003.

Sarfati, M., Mateo, V., Baudet, S., Rubio, M., Fernandez, C., Davi, F., Binet, J.L., Delic, J., Merle-Beral, H. Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 101, 265-269; 2003.

Savill, J. i Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788; 2000.

Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D.A., Matsuyama, S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol.*, 5(4):320-329; 2003.

Saxena, A., Viswanathan, S., Moshynska, O., Tandon, P., Sankaran, K., Sheridan, D.P. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.*, 75(1):22-33; 2004.

Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G.A., Dohner, H., Lichter, P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 748-753; 1999.

Schneider R, Agol VI, Andino R, Bayard F, Cavener DR, Chappell SA, Chen JJ, Darlix JL, Dasgupta A, Donze O, i col. New ways of initiating translation in eukaryotes. *Mol Cell Biol.*, 21(23):8238-8246; 2001.

- Schubert, K.M. i Duronio, V. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem. J.* 356, 473-480; 2001.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. *Science* 300: 135-139; 2003.
- Sedlak, J., Hunakova, L., Duraj, J., Chorvath, B., Novotny, L. Effects of protein kinase C inhibitor, staurosporine derivative CGP 41 251, on cell cycle, DNA synthesis and drug uptake in neoplastic cell lines. *Anticancer Drugs.* 6, 70-76; 1995.
- Senderowicz, A.M. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia*, 15, 1-9; 2001.
- Sherill, K.W., Byrd, M.P., Van Eden, M.E., Lloyd, R.E. BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *J Biol Chem.*, 279(28):29066-29074; 2004.
- Shiff, S.J. i Rigas, B.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology*, 113(6):1992-1998; 1997.
- Shinjo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K., Inaba, T. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol.*, 21(3):854-864; 2001.
- Shu, H.B., Takeuchi, M., Goeddel, D.V. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci*, 93(24):13973-13978; 1996.
- Snowden, R.T., Sun, X.M., Dyer, M.J., Cohen, G.M. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia*, 17(10):1981-1989; 2003.
- Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., Medema, R.H. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol*, 168(10):5024-5031; 2002.
- Stankovic, T., Weber, P., Stewart, G., Bedenham, T., Murray, J., Byrd, P.J. col. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 353 (9146):26-29; 1999.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217-245; 2000.
- Sulston, J.E. Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 275, 287-297; 1976.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446; 1999.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., Takahashi, R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.*, 8(3):613-621; 2001.
- T**
- Tee, A.R. i Proud, C.G. Staurosporine inhibits phosphorylation of translational regulators linked to mTOR. *Cell. Death. Differ.* 8, 841-849; 2001.
- Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267 (5203):1456-1462; 1995.
- Thornberry, N.A. i Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381):1312-1316; 1998.
- Thornton, P.D., Gruszka-Westwood, A.M., Hamoudi, R.A., Atkinson, S., Kaczmarek, P., Morilla, R.M., Hilditch, B.L., A'Hern, R., Matutes, E., Catovsky, D. Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *The Hematology Journal* 5, 47-54; 2004.
- Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Calle, E.E., Flanders, W.D., Heath, C.W. Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 325, 1593-1593; 1991.
- Tobin, G., Skogsberg, A., Thunberg, U., Laurell, A., Aleskog, A., Merup, M., Sundstrom, C., Roos, G., Nilsson, K., Rosenquist, R. Mcl-1 gene promoter insertions do not correlate with disease outcome, stage or V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 10 Març; 2005.

BIBLIOGRAFIA

Townsend, K.J., Trusty, J.L., Traupman, M.A., Eastman, A., Craig, R.W. Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C. *Oncogene*, 17(10):1223-34; 1998.

Townsend, K.J., Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C.K., Lowrey, C.H., Yen, A., Craig, R.W. Regulation of Mcl-1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the Bcl-2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 274, 1801-1813; 1999.

Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678):1097-1099; 1984a.

Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*, 224 (4656):1403-1406; 1984b.

U

U, M., Miyashita, T., Shikama, Y., Tadokoro, K., Yamada, M. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett.*, 509, 135-141; 2001.

V

Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442; 1988.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., Korsmeyer, S.J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75(2):229-240; 1993.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing inhibitor of apoptosis (IAP) proteins. *Cell* 102: 43-53; 2000.

Verma, S., Zhao, L.J., Chinnadurai, G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem.*, 276(7):4671-4676; 2001.

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., Strasser, A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302(5647):1036-1038; 2003.

Vousden, K.H. i Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews in Cancer* 2, 594-604; 2002.

Vucic, D., Stennicke, H.R., Pisabarro, M.T., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol.*, 10(21):1359-1366; 2000.

W

Waddell, W.R. i Loughry, R.W. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol*, 24(1):83-7; 1983.

Wang, J., Lobito, A.A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A., Lenardo, M.J. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *European Journal of Immunology*, 155-163; 2000.

Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 27;278(26):23861-23867; 2003.

Ward, A.C., Touw, I., Yoshimura, A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19-29; 2000.

Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., Tang, H. Specific cleavage of MCL-1 by caspase-3 in trail-induced apoptosis in jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem*. 2005.

Weston, C.R., Balmanno, K., Chalmers, C., Hadfield, K., Molton, S.A., Ley, R., Wagner, E.F., Cook, S.J. Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene*, 6;22(9):1281-93; 2003.

Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., Ham, J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, 29, 629-643, 2001.

Wickremasinghe, R.G., Ganeshaguru, K., Jones, D.T., Lindsay, C., Spanswick, V.J., Hartley, J.A., Wadhwa, M., Torpe, R., Hoffbrand, A.V., Prentice, H.G., Mehta, A.B. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 114, 608-615; 2001.

Woessner, S., Lafuente, R., Florensa, L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 3ra edición, Edicions Medici SA, Barcelona, 193-201; 1991.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.*, 139(5):1281-1292; 1997.

Wright, K., Kolios, G., Westwick, J., Ward, S.G. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation. Evidence for an interleukin-13-driven phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17193-17201; 1999.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.*, 68 251-306; 1980.

Y

Yang, T., Kozopas, K.M., Craig, R.W. The intracellular distribution and pattern of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell. Biol.* 128, 1173-1184; 1995.

Yang, T., Buchan, H.L., Townsend, K.J., Craig, R.W. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 166, 523-536; 1996.

Yang, Y.L. i Li, X.M. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.*, 10(3):169-177; 2000a.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288(5467):874-877; 2000b.

Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., Mak, T.W. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, 94, 739-750; 1998.

Z

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockey, J., Korsmeyer, S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) *Cell* 87, 619-628; 1996.

Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290: 1761-1765; 2000.

Zhang, B., Gojo, I., Fenton, R.G. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*. 99, 1885-1893; 2002.

Zhang, L. i Insel, P.A. The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A-and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J Biol Chem*, 14;279(20):20858-20865; 2004.

Zhou, P., Qian, L., Kozopas, K.M., Craig, R.W. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*, 89, 630-643; 1997.

Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C.K., Noelle, R., Binder, M., Levy, N.B., Craig, R.W. Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood*. 92, 3226-3239; 1998.

Zhu, Y., Swanson, B.J., Wang, M., Hildeman, D.A., Schaefer, B.C., Liu, X., Suzuki, H., Mihara, K., Kappler, J., Marrack, P. Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci*, 18;101(20):7681-7686; 2004.

Zinkel, S.S., Ong, C.C., Ferguson, D.O., Iwasaki, H., Akashi, K., Bronson, R.T., Kutok, J.L., Alt, F.W., Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev.*, 17(2):229-239; 2003.

Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. Thompson, C.B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.*, 15 (12), 1481-1486; 2001.

Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., Thompson, C.B. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 162, 59-69, 2003.

ABREVIACIONES

ABREVIACIONS

ABB: d'*Annexin Binding-buffer* (tampó d'unió d'anexina)
 AIF: d'*Apoptosis-Inducing Factor*
 Anexina V-FITC: anexina conjugada amb isotiocianat de fluoresceïna
 Anexina V-PE: anexina conjugada amb ficoeritrina
 ANT: d'*Adenine Nucleotide Translocator* (translocador de nucleòtids d'adenina)
 Apaf-1: d'*Apoptotic protease activating factor-1*
 ASA: aspirina (àcid acetilsalicílic)
 ATM: d'*atàxia telangiectàsia mutada*
 BH: de *Bcl-2 homology*
 BIR: de *Baculoviral IAP repeat*
 BIRPs: de *BIR-containing proteins*
 BIM: de *Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death*
 BisI: bisindolylmaleimide I (inhibidor de la PKC)
 BMP: de *Bone morphogenic protein*
 CAD: de *caspase-activated DNase*
 CARD: de *caspase recruitment domain* (dominis de reclutament de caspases)
 CASPASES: de *cysteine-aspartate-proteases*
 Cdks: de *Cyclin-dependent kinases*
 Ced: de *Cell death proteins (genes)*
 COX: ciclooxigenasa
 CRE: de *cAMP-responsive element*
 DAG: diacilglicerol
 DD: de *Death domain* (dominis de mort)
 DEDs: de *Death effector domain* (dominis efectors de la mort)
 Dexa: Dexametasona (és un glucocorticoid)
 Diablo: de *Direct IAP binding protein with low pI*
 DISC: de *Death-inducing signaling complex*
 DMSO: dimetilsulfòxid
 ECCC: de *European Collection of Cell Cultures*
 EGF: de *Epidermal growth factor*
 ERK 1/2 : de *Extracellular signal-regulated kinase, p42/p44*
 FAD: de *Flavine adenine dinucleotide*
 FADD: de *Fas-associated death domain* (també anomenat MORT-1)
 FAK: de *Focal adhesion kinase*
 FBS: de *Foetal bovine serum* (sèrum fetal boví)
 FLICE: de *FADD-like ICE*
 FLIP: de *FLICE inhibitory protein*
 GFP: de *Green Fluorescent Protein*
 GM-CSF: de *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
 GSK: de *serum and glucocorticoid-induced kinases*
 h: hores
 HtrA2 / Omi: de proteïna HtrA induïble per "heat-shock" d'*Escherichia coli*
 IAP: de *Inhibitor of apoptosis proteins* (proteïnes inhibidores de l'apoptosi)
 ICAD: de *Inhibitor of caspase-activated DNase*
 ICE: de *IL-1 β converting enzyme*
 IFN: interferó
 IKK: de *Inhibitor of κ B (I- κ B) Kinase complex*
 IL: interleucina
 IP: iodur de propidi
 IRES: de *Internal ribosome entry site*
 Jak: de *Janus Kinase*
 JNK: de *c-Jun N-terminal Kinase*
 Kb: de *kilobases*
 LLC-B: leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B
 LPS: lipopolisacàrid
 LY: LY294002 (inhibidor selectiu de la PI3K)

ABREVIACIONS

M: molar
MAPK: de *Mitogen-activated protein kinase*
Mcl-1: de *Myeloid cell leukaemia-1*
MEKK1: de *MAP/ERK kinase kinase-1*
min: minuts
mM: miliMolar
NAIP: de *Neural apoptosis inhibitory protein*
NF- κ B: de *Nuclear factor κ B*
NOD: de *nucleotide-binding oligomerization domain*
AINEs: drogues antiinflamatòries no esteroidals (de l'anglès NSAIDs)
PAK2: de *p21-activated kinase 2*
PARP: de *Poly(ADP)ribose polymerase*
Pb: parells de bases
PCBP: de *poly(C) binding protein*
PCNA: de *proliferating cell nuclear antigen*
PCR: de *Polymerase Chain Reaction* (reacció en cadena de la polimerasa)
PDE: de *phosphodiesterase*
PIP₃: fosfatidil inositol trifosfat
PI3K: de *phosphatidylinositol-3 kinase*
PKA: proteïna quinasa A (de *c-AMP-dependent protein kinase*)
PKB/Akt: proteïna quinasa B
PKC: proteïna quinasa C
PKG: proteïna quinasa G (de *cGMP-dependent protein kinase*)
PTB: de *polypyrimidine tract binding protein*
p70^{S6K}: de *p70 S6-kinase*
RNAi: de *RNA interference* (RNA d'interferència)
Rapa: de rapamicina (inhibidor específic de p70^{S6K})
RE: reticle endoplasmàtic
RZFs: de *RING zing-fingers*
RIP: de *Receptor-Interacting Protein*
ROS: de *Reactive Oxygen Species* (espècies reactives de l'oxigen)
RT-PCR: assaig de retrotranscripció-PCR
SDF-1: de *Stromal cell-derived factor-1*
SDS: dodecil sulfat sòdic
Ser: residu de serina
Smac: de *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*
Ssp: estaurosporina
STAT: de *Signal transducer and activator of transcription*
TAK1: de *Transforming growth factor-beta-activated kinase 1*
Taq Pol: polimerasa de *Thermus aquaticus*
TBE: tampó Tris-Borat-EDTA
TBST: tampó Tris-salí amb Tween-20
TCR: de *T-cell receptor*
TNF: de *Tumor Necrosis Factor*
TNFR: receptor de TNF
TPA: forbol 12-miristat 13-acetat (èster de forbol, també es diu PMA)
TRADD: *TNFR1-associated death domain*
TRAF: de *TNFR-associated factor*
TRAIL: de *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
UV: ultraviolada
V: volts
VDAC: Voltage-dependent anion channel (o porina)
XAF1: d'*XIAP Associated Factor 1*
Z-VAD.fmk: benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (inhibidor caspases)
 μ F: microFaradis (capacitància)
 μ M: microMolar
 μ g: micrograms
5'-UTR: de *Untranslated region* (regió 5'-no traduïda del gen)

PUBLICACIONES

PUBLICACIONS

Les publicacions derivades d'aquesta Tesi s'adjunten a continuació i són les següents:

1. Iglesias-Serret, D., Pique, M., Gil, J., Pons, G., Lopez, J.M. Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. Arch Biochem Biophys., 417(2):141-152; 2003.
2. Iglesias-Serret, D., Coll-Mulet, L., Santidrián, A.F., Navarro-Sabaté, A., Domingo, A., Pons, G., Gil, J. Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. Letter to Editor. J Natl Cancer Inst. (in press); 2005.

