

ABSTRACT

IMPLICACIÓ DE L'ESTAT REDOX DEL CITOCROM C EN L'APOPTOSI I EN EL FENOMEN DE QUIMIORESISTÈNCIA

Nom i Cognoms	Universitat de procedència	Universitat de recerca / País	Departament
Pau Castel Morales	Facultat de Farmàcia/ Universitat de Barcelona	Facultat de Farmàcia/ Universitat de Barcelona/ /Espanya	Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Autor/s: Castel P.; Noé V.; Ciudad C.J.

L'apoptosi és un fenomen essencial en la fisiologia del desenvolupament i el seu descontrol pot tenir repercussions en la patologia molecular de diferents malalties. S'ha atribuït una disminució de l'apoptosi a gran part de processos oncogènics i al desenvolupament de quimioresistència.

Experiments de “*differential display*” duts a terme al nostre grup ens van fer pensar que una de les claus de la reducció d'apoptosi en la quimioresistència podia residir en la participació del citocrom c prèviament i/o posteriorment a la seva alliberació del mitocondri. Vam hipotetitzar que el seu estat redox podia influir en la seva sortida ja que es produeixen diferències notables en les propietats fisicoquímiques del citocrom c quan està reduït o oxidat.

Tenint en compte que el citocrom c es comporta com a *carrier* electrònic entre els complexos de la cadena respiratòria vam idear unes aproximacions experimentals per a comprovar quina de les formes d'oxidació era més susceptible al procés apoptòtic i al desenvolupament de la resistència al metotrexat.

Una manera d'incrementar l'estat de reducció del citocrom c va ser silenciar la citocrom c oxidasa i per això: i) es va fer una inhibició farmacològica; i ii) estem generant una línia cel·lular *knock out* d'aquest complex utilitzant cèl·lules de pacient amb mutació al gen COXI del mtDNA que donen un fenotip de complex IV no viable i que es fusionarien per la tècnica del híbrid transmitocondrial amb les nostres cèl·lules de treball (MCF7 – línia d'adenocarcinoma de mama).

D'altra banda es van usar inhibidors del complex III (antimicina A i mixotiazol) i el reductor específic de citocroms *N,N,N',N'*-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD).

En aquests tractaments es va quantificar la externalització de fosfatidilserina (PS), la despolarització mitocondrial ($\Delta\Psi_{mt}$) i la citotoxicitat a diferents temps. A més es van realitzar *Western blot* del trencament de PARP com a indicador d'activitat caspasa i l'activació de la caspasa 9. També vam estudiar amb detall els mecanismes d'alliberació del citocrom c amb experiments de *time course* (microscopia confocal) i ultraestructura (microscopia electrònica de transmissió).

Dels resultats previs s'ha escollit el tractament amb TMPD, per a quantificar l'alliberament de citocrom c per citometria de flux (FACS) i immunocitoquímica, i per explorar la participació de les proteïnes Bax, Bcl-2, Bcl-X_{L/S} i Mcl-1 mitjançant experiments de *Western blot*. Finalment, vam estudiar la formació de colònies resistents al metotrexat i la sensibilització en cèl·lules resistents.

L'experimentació realitzada ens ha donat evidències de què el tractament de cèl·lules MCF7 amb inhibidors del complex IV i/o reductors específics del citocrom c produïen una disminució en l'apoptosi i revertien el potencial de membrana quan eren tractades amb agents apoptòtics

Es va observar que el citocrom c reduït era capaç de rescatar la cèl·lula de l'apoptosi, però només a curt termini. Aquesta evasió temporal podria facilitar el desenvolupament de mecanismes alternatius de resistència, com es va comprovar en assaigs de clonogenicitat.

Actualment treballem amb la hipòtesi de què pot existir una diferent interacció entre el citocrom c, quan està en diferents estats d'oxidació, i les proteïnes que estan mitjançant la seva sortida del mitocondri o l'associació amb Apaf-1.

La meva participació en aquest projecte ha estat de dedicació exclusiva portant a terme la totalitat dels experiments.