



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

MÁSTER OFICIAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Estudio del efecto de la NEDDilación sobre la expresión de MMP-9 en un modelo de Leucemia Linfática Crónica.

ANDREA SAMANTHA VARGAS LUNA

DIRECTOR  
CARLOS PIPAÓN GONZÁLEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARQUÉS DE VALDECILLA -  
IDIVAL

2019

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>OBJETIVO</b> .....	4
<b>HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>Descripción de la Leucemia Linfática Crónica</b> .....	5
<b>Diagnostico de la LLC</b> .....	5
<b>Tratamiento de la LLC</b> .....	7
Forskolina .....	7
Bortezomib .....	8
Interleuquina 1- $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	9
LY 294002 .....	9
<b>Alteraciones citogenéticas de la LLC</b> .....	10
<b>Etiología de la LLC</b> .....	10
<b>Microentorno en LLC y su relación con MMP-9</b> .....	12
Vías de Regulación de MMP-9 .....	13
<b>NEDDilación en la LLC</b> .....	14
<b>Línea Celular MEC-1</b> .....	16
<b>Datos Previos</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
<b>1. Cultivo Celular</b> .....	17
<b>2. Tratamiento con Fármacos</b> .....	18
<b>3. Transfección</b> .....	19
<b>4. Determinación de Expresión Génica:</b> .....	20
4.1. Análisis de RNA .....	20
4.2. Análisis de Proteína .....	22
<b>5. Luciferasa</b> .....	24
<b>6. Clonajes</b> .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	27
<b>Efecto de MLN4924 sobre la viabilidad de células MEC-1</b> .....	27
<b>Influencia de MLN4924 sobre la expresión génica en células MEC-1</b> .....	28
<b>Estudio del efecto de MLN4924 sobre las rutas reguladoras de MMP-9</b> .....	29
Ruta NF-kB .....	29
Ruta AP1 .....	30
Efecto de PKA y NURR1 .....	31
<b>Intervención del estroma sobre las células MEC-1</b> .....	32
<b>Obtención de clonajes</b> .....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	34
<b>CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>REFERENCIAS</b> .....	38

## ABSTRACT

### **Neddylation effect on MMP-9 expression in a model of Chronic Lymphocytic Leukemia**

Andrea Samantha Vargas Luna

Carlos Pipaón González

Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla – IDIVAL

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a malignant disease caused by the accumulation of mature B lymphocytes due to an inherent defect in apoptosis. This effect is produced by the constitutive activation of different signaling pathways. MMP-9 plays an important role in the survival, angiogenesis and metastasis by the activation and regulation of survival signaling pathways. MMP-9 promoter contains several binding sites for AP-1 and NF- $\kappa$ B transcription factors. Previous studies from our group described that an inhibition of neddylation with MLN4924 in CLL cells represses the expression of MMP9 in parallel with an increase in apoptosis. Therefore, we focused our study on the effect of this drug on the expression of MMP-9 and how it is regulated by NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways in MEC-1, a cell line of Chronic Lymphocytic Leukemia. To achieve this aim, we compared the effect of MLN4924, LY294002 (PI3K inhibitor) and IL-1 $\beta$ , Forskolin and Bortezomib (proteasome inhibitor) in MEC-1 and in B-CLL cells. We also determined cell death, mRNA and protein expression by flow cytometry, RT-qPCR and Western Blot, respectively. A dose-dependent effect on cell death by apoptosis was determined upon treatment with MLN4924, but not with LY294002. However, MMP-9 and genes regulated by NF- $\kappa$ B (BCL-2, MCL-1, TANK, XIAP, BCL-XL) were overexpressed at mRNA level with the increment of MLN4924. On the other hand, IL-1 $\beta$  has an effect on the expression of Bcl-2 and not on MMP-9. Moreover, we observed the upregulation of MMP-9 and NURR1 on MEC-1 and B-CLL cells after the treatment with Forskolin. Furthermore, Bortezomib has an effect dose-dependent on MMP-9 overexpression. Altogether, our results demonstrate that the regulation of MMP-9 by MLN4924 in MEC-1 cells differs from that in primary B-CLL cells; MLN4924 induces MMP-9 in MEC-1 cells, as it does with NURR1. Nonetheless, the co-culture with HS-5 cells induced MMP-9 expression in MEC-1 cells, but the same did not happen with the NURR1 expression. However, the treatment with Bortezomib and MLN4924 reversed the induction of MMP9 by co-culture with HS-5 cells. Our data suggest a common regulatory pathway for MMP-9 and NURR1 in MEC-1 cells.

## **OBJETIVO**

- Utilizando como modelo la línea celular de Leucemia Linfática Crónica MEC1, estudiar los mecanismos moleculares por los que la NEDDilación regula la expresión de MMP9.

## **HIPÓTESIS**

Datos previos obtenidos en el laboratorio demuestran que la inhibición de la NEDDilación por MLN4924 disminuye los niveles de expresión del mensajero de MMP-9 en células primarias de pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC). Por lo tanto, MEC-1 como modelo de LLC es una herramienta útil para la investigación sobre los mecanismos moleculares por los que la NEDDilación regula la expresión de MMP-9.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Descripción de la Leucemia Linfática Crónica**

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) se considera que es una enfermedad maligna causada por la acumulación de linfocitos B, por un defecto inherente en la apoptosis. Las últimas investigaciones demuestran que se trata de un proceso dinámico, en el que se produce una proliferación monoclonal de los linfocitos B en los centros de proliferación pseudofolicular. Los linfocitos aparentemente maduros pueden distribuirse a través de la sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo (Motta et al, 2009; Landgren et al, 2009).

Este tipo de leucemia es mayormente frecuente en el occidente, menos común en Asia, Japón y Corea, y en Norte América afecta aproximadamente a 6 de cada 100,000 personas. La incidencia promedio de LLC varía entre individuos en diferentes regiones geográficas, representando un porcentaje <0.01 de afectados en Asia oriental, aproximadamente 0.06% afectados en Europa y Estados Unidos. Por lo general, la edad a la que se diagnostica oscila entre los 70 a 72 años en adelante, con un porcentaje muy bajo a la edad de 55 años (Bird et al, 2004; Rawstron et al, 2008). Afecta dos veces más a hombres que a mujeres, con ligeras variaciones entre poblaciones de diferentes continentes.

Las personas que padecen LLC pueden presentar manifestaciones clínicas variables, ya que puede ser muy agresiva llegando a ser mortal o presentarse de forma indolente, no requiriendo tratamiento por varios años. Se considera indispensable la determinación de la etapa en la que se ha generado la aberración en el linfocito y las alteraciones genéticas presentes debido a que estas influyen directamente en el comportamiento de la enfermedad, por ende, la evolución de esta. Estas variaciones son consideradas para la determinación del diagnóstico y a su vez, la aplicación del tratamiento adecuado. Para ello se realizan análisis de citometría de flujo donde se analizan los antígenos presentes en la superficie celular, lo que permite comprobar que todas ellas tengan apariencia de copias idénticas (Vladimirova et al, 2015).

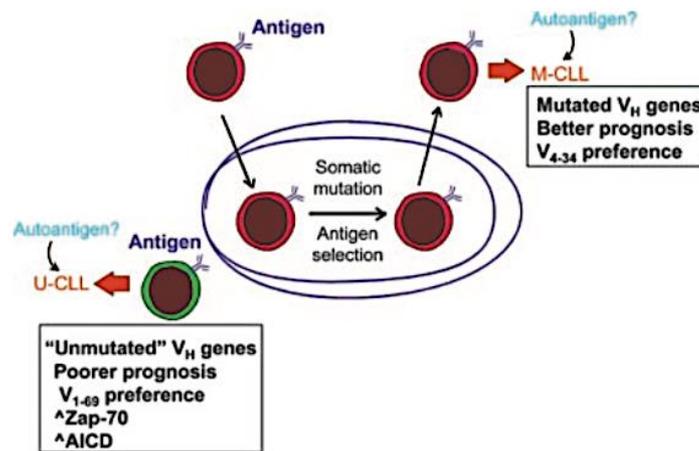
### **Diagnostico de la LLC**

En base al comportamiento clínico de LLC, puede estratificarse en dos subconjuntos principales en donde se analiza la región del gen variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgVH), con el fin de conocer si esta puede estar mutada o no, ya que eso determina la etapa de diferenciación de las células B. Si los linfocitos B expresan la IgVH no mutada, significa que no han experimentado la diferenciación en los centros germinales (sitios de los ganglios linfáticos donde las células B experimental hipermutación somática), por lo cual tiende a presentarse un cuadro de LLC más agresiva. Si las células B presentan la IgVH mutada, sugiere que ha experimentado hipermutación somática y en algunos casos un cambio de isotipo de inmunoglobulina (similar a linfocitos B normales en la respuesta inmune al antígeno), por lo que

es un cambio post-germinal, estos pacientes presentan una LLC menos agresiva. Cabe destacar que es un proceso normal que exista alto nivel de mutaciones somáticas de la IgVH en el centro germinal, por que permite la maduración de los anticuerpos por afinidad, y a diferencia de las mutaciones en otros genes, estas no son patológicas (Stevenson & Calagaris-Cappio, 2004; Hallek et al, 2008; Kipps et al, 2017).

La cantidad almacenada de inmunoglobulinas producidas por las células de LLC en los pacientes es menor que la cantidad almacenada que producen las células B en personas sanas. Lo que muestra un determinado sesgo de determinados genes de IgVH, que presentan una mutación somática limitada y una baja combinación de la cadena ligera y de unión. Se ha observado que alrededor de un tercio de los pacientes de LLC expresan un patón de inmunoglobulinas que son comúnmente una extensión de la estructura primaria de la región variable (Ver figura 1) (Stevenson & Calaris-Cappio, 2004).

Es de gran importancia las interacciones microambientales y externas, ya que es debido a estas que se producen algunos de los impulsos proliferativos de las células malignas, lo que en un panorama normal determinaría la apoptosis en los linfocitos B, a menos que su supervivencia se vea reforzada por estos estímulos externos. La interacción que se produce en las células de la LLC con diferentes tipos de células, como las células del estroma mesenquimatoso (MSC), las células derivadas de monocitos (NLC), las células dendríticas foliculares (FDC) y las células T es de importancia, ya que se ha establecido que estas interacciones microambientales son críticas para la supervivencia y la proliferación de las células leucémicas (Vladimirova et al, 2015).



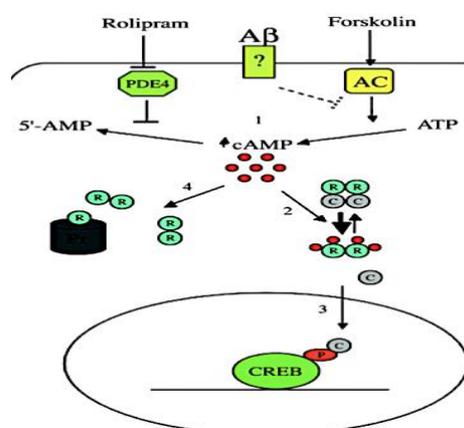
**Figura 1:** Mutación de IgVH y su relación con el diagnostico. (Stevenson & Calaris-Cappio, 2004).

## Tratamiento de la LLC

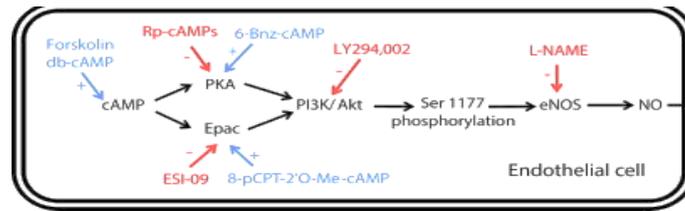
El tratamiento de los pacientes con LLC, está basado en diferentes estrategias, puede ser contrarrestada por quimioterapia, quimioterapia con la combinación de inmunoterapia, o a través de medicamentos dirigidos específicamente hacia las vías de señalización que están promoviendo el crecimiento y/o la supervivencia de las células de la LLC. En la terapia de primera línea se emplea la quimioinmunoterapia que consiste en la administración de un análogo de purina fludarabina, este medicamento puede suministrarse solo o en conjunto con otros fármacos como pueden ser los anticuerpos monoclonales anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab u ofatumumab) o los inhibidores de la quinasa (Motta et al, 2009). Por la naturaleza heterogénea de la LLC, se sabe que cuando los pacientes presentan características como IgVH no mutada y/o expresión alta de ZAP-70 o CD38, no responden bien a estos tratamientos. Lo que hace indispensable una búsqueda mas adecuada de compuestos que sean de utilidad (Vladimirova et al, 2015).

## Forskolina

La forskolina es un labdano diterpeno, que se emplea comúnmente para elevar los niveles del adenosín monofosfato cíclico AMPc a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa (Moon et al, 2003). El AMPc es un importante segundo mensajero necesario para la respuesta biológica propia de a las señales extracelulares. La sensibilidad de las células de la LLC a los agentes que elevan los niveles de cAMP como la forskolina, ha sugerido que la actividad proapoptótica esta dada por a su actividad como inhibidores de PDE de nucleótidos cíclicos no específicos, lo que dirige su actividad a los sitios CREB (Ver figura 2; Moon & Lerner, 2003). La inhibición de adenilato ciclasa (AC) produce una reducción en la producción de AMP cíclico celular (AMPC), la inhibición de fosfatidil inositol 3-quinasa PI3K/Akt y de la vía AP-1/ERK lo que disminuye la viabilidad celular y a su vez reduce la proliferación de las células cancerosas (Ver figura 3) (Dovin, 2018).



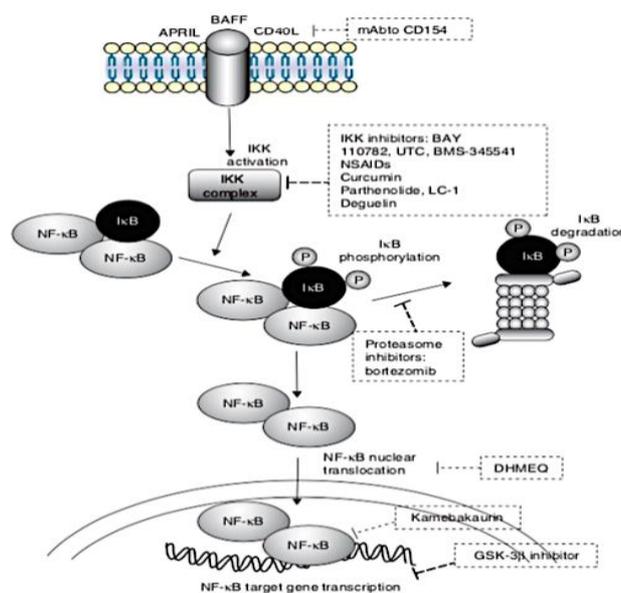
**Figura 2:** Mecanismos de acción de la Forskolina a través CREB (Dovin, 2018).



**Figura 3:** Mecanismo de acción de la Forskolina a través de PI3K (García-Morales et al, 2017).

### Bortezomib

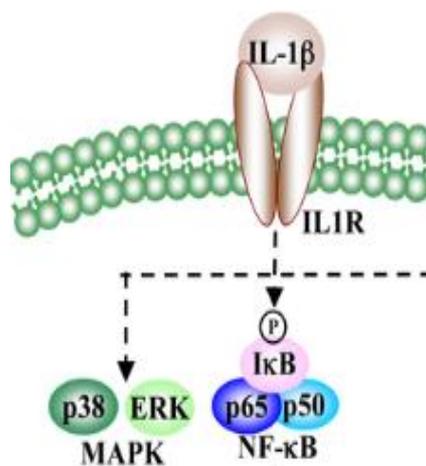
Bortezomib es el primer fármaco que tiene la capacidad de inhibir el proteosoma y que ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), por lo que se emplea para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como la LLC (Messinger et al, 2012). Aunque aún no se conoce por completo su capacidad anti-cáncer es claro que está involucrado en múltiples mecanismos del cáncer. Bortezomib tiene sinergia con dexametasona y aditivos como asparagina, entre otros. Estudios en fase I, sugieren que el bortezomib es asimilado de buena manera en combinación con idarubicina y citarabina en leucemia mieloide. Además, otras investigaciones han demostrado que la combinación de bortezomib con inhibidores de caseína quinasa 2 puede ser una novedosa terapia en células T y B (Bertaina et al, 2017). Un efecto indirecto se genera en la ruta NF- $\kappa$ B por la inhibición del proteosoma, ya que el bortezomib bloquea la degradación de I $\kappa$ B guiada por la acumulación de NF- $\kappa$ B en el citosol. A pesar de que se ha demostrado que bortezomib produce apoptosis en ensayos in vitro, no se indica similar efecto en la respuesta in vivo. Por lo tanto, no se conoce con exactitud la acción terapéutica de este fármaco, entonces no se puede asegurar que depende de la inhibición de NF- $\kappa$ B (López-Guerra & Colomer, 2010).



**Figura 4:** Acción del Bortezomib sobre NF- $\kappa$ B (López-Guerra & Colomer, 2010).

## Interleuquina 1-β (IL-1β)

La familia de IL-1β son citoquinas proinflamatorias y receptores que están asociadas principalmente a la respuesta inmune innata, por ende, están estrechamente relacionadas con las funciones de las células T y B. También puede promover la diferenciación y la activación de las células B-LLC (Arranza et al., 2017). En el tratamiento de la Leucemia Linfática Crónica se emplea para promover la activación mediante un anticuerpo recombinante de IL-1β, ya que tiene un rol importante en la patogenicidad (Dinarello, 2018). En respuesta a una inflamación la IL-1β es negativamente regulada por el factor de transcripción NF-κB, la cual a su vez activa rutas de supervivencia (Dinarello, 2018; Baud & Karin, 2009).



**Figura 5:** Cascada de señalización de la IL-1β (Reber et al, 2009).

## LY 294002

El fármaco Ly294002 es una molécula sintética, que actúa como inhibidor de la ruta de PI3K. Esta ruta está asociada a mecanismos de supervivencia celular, ya que actúa como inhibidor del proapoptótico Bcl-2 y la activación del factor de transcripción NF-κB. Además, la desregulación de PI3K promueve la proliferación celular, crecimiento, tráfico intracelular y diferenciación celular lo que contribuye al desarrollo del cáncer. Estudios preclínicos han demostrado que la inhibición de la ruta PI3K tiene efectos curativos notables en varios tipos de cáncer como: cáncer de piel, cáncer de mama, ya que promueve la muerte celular (Harvey & Lonial, 2007).

En la actualidad, los tratamientos convencionales no están dirigidos a las interacciones entre las células de la LLC y su microentorno, por lo que es fundamental la comprensión de mecanismos que permitan tener mejores terapias para los pacientes. Ya que probablemente esta sea una de las razones por las cuales, a pesar del progreso significativo en el tratamiento, la enfermedad sigue siendo incurable.

En este sentido, se debe enfatizar en los estudios de tratamientos que consideren las interacciones intercelulares de la población leucémica que permiten la clarificación de procesos clave en el

desarrollo de la enfermedad y pueden ser la base para definir un grupo de pacientes de riesgo separado para optimizar los enfoques terapéuticos, lo que los hará relevante y prometedor.

### **Alteraciones citogenéticas de la LLC**

Diversas investigaciones han permitido establecer determinadas translocaciones que involucran genes de las inmunoglobulinas (IG), con algunas excepciones en el reordenamiento de BCL-2, BCL-3 y MYC, los cuales se observan en alrededor del 2% de los casos. Estudios han sido capaces de identificar lesiones recurrentes de relevancia pronóstica asociadas con la LLC, y estas son del13q14 (50–60% de los casos), del17p13 (5–10%), del11q22 (6–20%), trisomía 12 (10–18%) y ganancia de 2p (5–28%). Sin embargo, se han determinado cuatro aberraciones citogenéticas clásicas como: deleciones del cromosoma 13q, 17p y 11q, trisomía del cromosoma 12, las cuales han sido identificadas como marcadores de pronóstico altamente relevantes, debido a que permiten la estratificación de los pacientes con LLC en distintos grupos, considerando el curso clínico y la supervivencia (Roos-Weil et al, 2015; Vladimirova et al, 2015).

La deleción del brazo largo del cromosoma 13, es un marcador relativamente favorable cuando se aísla, ya que se ha descrito que indica un desarrollo temprano en la LLC, mientras que las deleciones de 11q y 17p y 2p se asocian con la progresión y la recaída (Kipps et al, 2017).

Los factores genéticos contribuyen claramente a la susceptibilidad a la enfermedad; entre los datos obtenidos de pacientes con LLC, se conoce que el 9% tienen un familiar con LLC. Además, los familiares de primer grado de pacientes con LLC tienen un riesgo ocho veces mayor de desarrollar esta enfermedad, y en los estudios de concordancia la LLC se presenta en mayor porcentaje entre los gemelos monocigóticos que entre los gemelos dicigóticos. Los estudios de asociación genómica han identificado SNP en la región que codifica una proteína anti-apoptótica BCL-2 que se expresa en niveles altos en la CLL (Heidari et al, 2017).

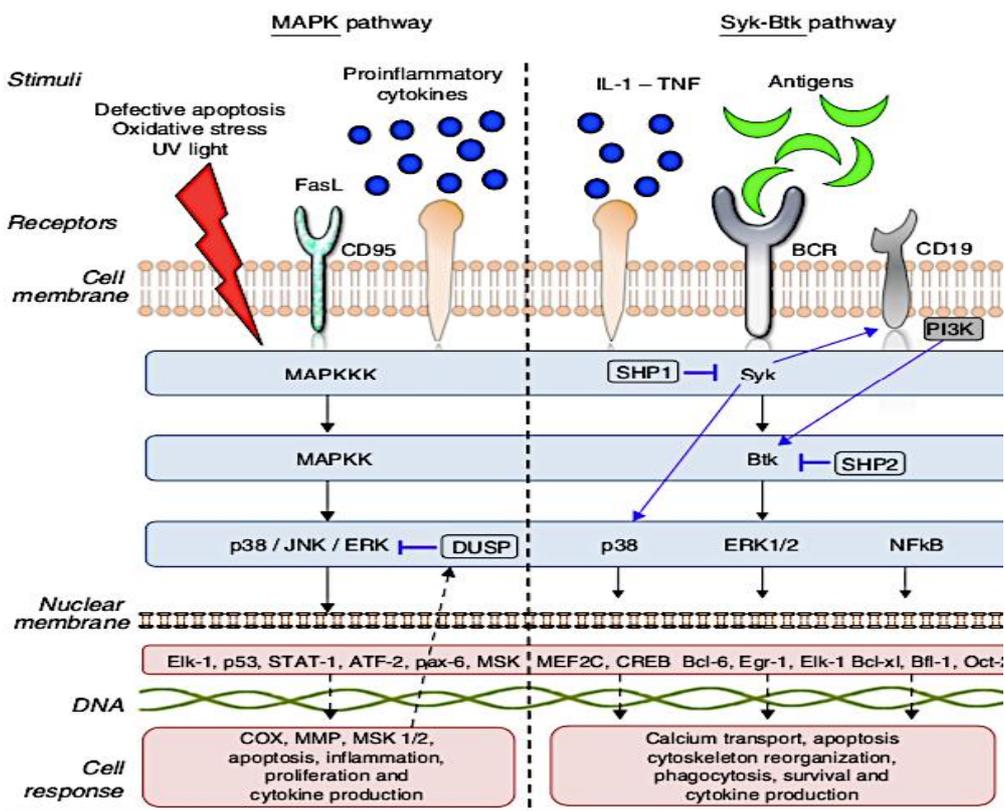
### **Etiología de la LLC**

La etiología de esta enfermedad es de carácter heterogéneo, como la mayoría de los diferentes tipos de cáncer. Se cree que la principal causa de la LLC, esta dada por la intervención de los receptores de las células B (BCR), el cual esta compuesto por una molécula de inmunoglobulina transmembrana (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) unida a un ligando. Un receptor BCR funcional es necesario para la supervivencia de los linfocitos B maduros, pero en la LLC la evidencia sugiere que la unión de uno o varios antígenos de la misma especificidad al receptor BCR estimula el entrecruzamiento de otras Ig vecinas al receptor ligando, esto genera señales intracelulares que incrementan la expresión de receptores coestimuladores y la activación de rutas de supervivencia (Chiorazzi et al, 2005).

BCR también tiene la capacidad de coordinar la actividad de otros receptores de superficie incluyendo las integrinas. Además, los quimio receptores 4 (CXCR4) están downregulados por

el receptor BCR defectuoso, y a su vez pueden desencadenar señales internas o externas que activan  $\alpha 4\beta 1$  integrina. Y estos pueden ser reconocidos por un antígeno en los tejidos linfáticos afectando de esta forma la adhesión y migración de la LLC. Por otro lado, se ha determinado que la modulación de las vías de BTK y PI3K a través de las señales de estos quimio receptores contribuye al incremento de la linfocitosis en pacientes. Así mismo, se conoce que la desregulación de la actividad de la fosfoinositida-3-quinasa (PI3K), pueden comprometer a los receptores BCR, volviendo a estos insensibles a la estimulación (Kipps et al, 2017).

Por otro lado, estudios muestran que CD38, CD49d, MMP9 y CD44 están asociados físicamente en un complejo de superficie celular supramolecular, el cual no esta presente en las células B normales. Teniendo en cuenta las propiedades conocidas de las moléculas individuales y su superposición funcional, parece que el complejo CD38 / CD49d / MMP9 / CD44 desempeña un papel en la migración hacia los tejidos y en la señalización de supervivencia (Stevenson et al, 2004; Hellek et al, 2008).

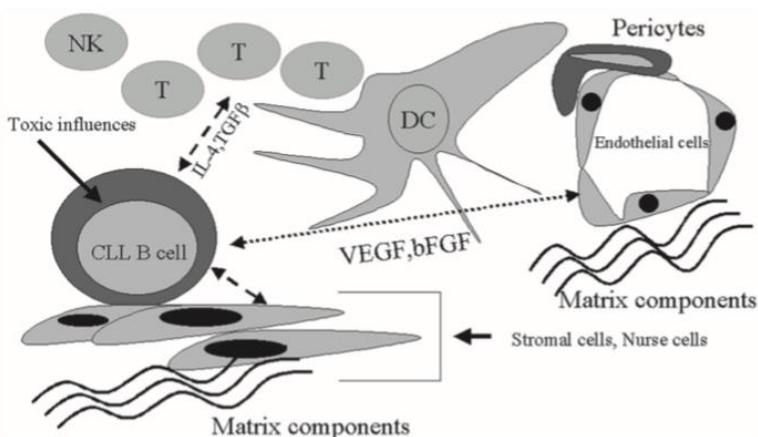


**Figura 6:** Principales rutas de intervención en Leucemia Linfática Crónica (Hernandez & Valor, 2016).

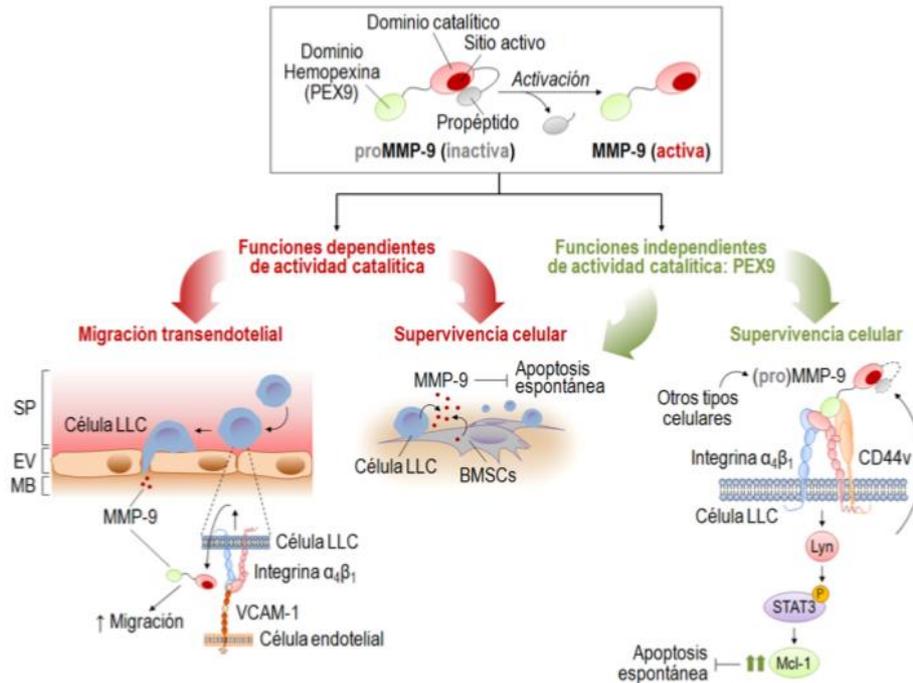
### Microentorno en LLC y su relación con MMP-9

Es relevante considerar el microentorno en la LLC, ya que algunos componentes celulares y moleculares tienen la capacidad de proporcionar e inducir señales de supervivencia, lo que incluso puede llegar a favorecer la resistencia a los fármacos. Un componente clave de los nichos de LLC es la metaloproteínasa de matriz-9 (MMP-9), esta enzima de 92 kDa pertenece a la familia de MMP, y es la encargada de la descomposición de colágenos desnaturalizados, nativos de tipo IV y V, elastina y muchos más, como las moléculas de superficie y los receptores. MMP-9 tiene participación en diversos procesos, migración, supervivencia y la angiogénesis de células tumorales, por lo que se expresa en las células de LLC y esta regulada por varios estímulos (Tandon & Sinha, 2011; Bauvois et al, 2002). MMP-9 particularmente, se ha asociado con la capacidad de invasión de células cancerosas, metástasis y progresión tumoral, debido a las funciones que ejerce y su expresión en varios tejidos y tipos de células, incluyendo el linaje linfocítico. MMP-9 se encuentra sobrepresada en las células B monoclonales, lo que genera una mayor capacidad de infiltración en el tejido linfocítico mediante la degradación proteolítica de las membranas basales y los componentes de la matriz extracelular. Independientemente de su actividad proteolítica, MMP-9 media parcialmente las señales antiapoptóticas en los linfocitos monoclonales en presencia de las células estromales de médula ósea (Ram et al, 2006).

En algunos estudios se ha planteado que, MMP-9 afecta la respuesta de las células LLC a la quimioterapia, por lo que MMP-9, como otras MMP, pueden desempeñar una doble función en la apoptosis mediante la activación de genes de supervivencia, o ya sea facilitando o antagonizando la acción de fármacos (Ramón de la Fata et al, 2013).



**Figura 7:** Influencia del microentorno sobre Linfocitos B (Kay et al, 2002).



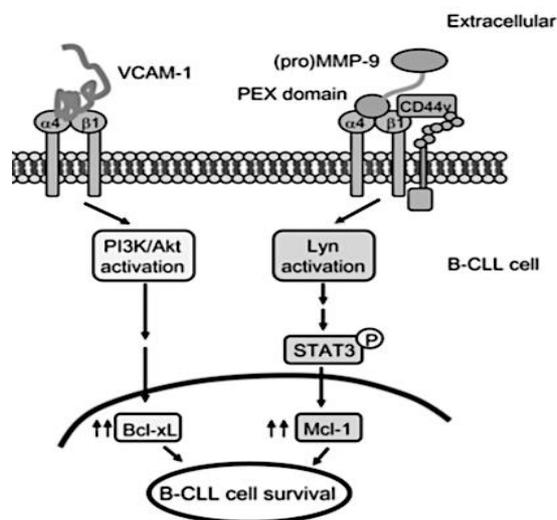
**Figura 8:** Diferentes funciones de MMP-9, dada su función catalítica y no catalítica (Amigo, 2015).

#### Vías de Regulación de MMP-9

La MMP-9 exógena y/o endógena se une a los linfocitos B a través de receptores de acoplamiento específicos como integrina  $\alpha_4\beta_1$  y CD44v, y regula la migración celular. MMP-9 unida a la superficie tiene la capacidad de prevenir la apoptosis espontánea de las células LLC, por un mecanismo no catalítico, que se basa en la activación de Lyn (nueva tirosina quinasa) /STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) y la regulación positiva de Mcl-1, lo que contribuye a la progresión de la LLC. Los linfocitos B monoclonales de la médula ósea y de los ganglios linfáticos expresan niveles elevados de MMP-9 de superficie, lo que muestra la activación de células tumorales en microambientes de tejidos (Vladimirova et al, 2015; Rendon-Muñoz et al, 2010;).

En lo referente a MMP-9, muchos factores de crecimiento, citocinas, promotores de tumores y oncogenes inducen la expresión de la proteína a través de la activación de sus promotores genéticos por vías de transducción de señales. Una característica predominante de la LLC es que algunas vías de señalización están activadas de forma constitutiva y contribuyen al defecto de la apoptosis. Entre las vías que se encuentran activadas está el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) y la proteína activadora 1(AP-1). El promotor MMP-9 contiene varios sitios de unión NF- $\kappa$ B y AP-1 factores de transcripción. Esta última media la regulación de MMP-9 a través de la inducción de p38 (Ringshausen et al, 2004). La intervención de estas rutas de señalización esta estrechamente ligado con la capacidad de invasión y metástasis en cáncer (Lin et al, 2008).

NF- $\kappa$ B induce la expresión de inhibidores de la apoptosis como Xiap y la familia Bcl-2, la cual inhibe la función de los miembros proapoptóticos como Bcl-xl (Dolcet et al, 2005). Muchas de las señales de supervivencia procedentes del microambiente convergen en la regulación de varias rutas de señalización en las células LLC, que convergen en varios miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo Mcl-1, Bcl-xl, Tank y niveles elevados de estas proteínas se han asociado con resistencia a fármacos (Godbersen et a, 2015; Roos-Weil et al, 2016; Amigo, 2015). Por un lado, NF- $\kappa$ B activa el promotor de NURR1 el cual actúa como supresor de MMP-9, y a su vez NURR1 cumple la función de antagonista de IL-1 $\beta$  inducido por MMP9 (Mix et al, 2007; MacEvoy et al, 2002). Por otro lado, el promotor de NURR1 es activado la proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB) ante una respuesta inflamatoria. Esta activación esta mediada por proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (Mix et al, 2007). En lo que respecta a, NURR1 es un receptor nuclear huérfano que tiene un rol clave en la regulación de citoquinas y factores de crecimiento en respuestas inflamatorias, se expresan ampliamente en distintos tipos de células y tejidos. Estos receptores pueden interactuar con otros factores de transcripción y proteínas co-reguladoras modulando la expresión génica. Además, este receptor contribuye a la transformación celular y promueve el crecimiento de tumores por que potencian la proliferación y la supervivencia (Mix et al, 2007).



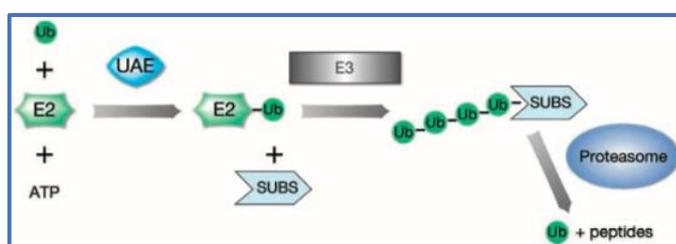
**Figura 9:** Intervención de MMP-9 en las cascada de activación de rutas de supervivencia (Redondo Muñoz et al, 2009).

### NEDDilación en la LLC

El sistema de ubiquitina-proteosoma, se encarga de la degradación de proteínas intracelulares aberrantes o no necesarias para el mantenimiento de la homeostasis celular. La desregulación de este sistema a través de la activación constitutiva de las vías de señalización específicas o la

perdida de la función de estas, puede resultar en una proliferación no controlada y la activación de vías de supervivencia promoviendo el desarrollo de cáncer (Hjerper et al, 2012).

El proceso de degradación de las proteínas por parte del proteosoma empieza con el marcaje mediante la adición covalente de una cola de poliubiquitina. La ubiquitinación está dada por una cascada multienzimática, que inicia con la activación de la enzima E1-ubiquitina mediada por ATP, esta molécula de ubiquitina se transfiere de la enzima E1 a la enzima E2-conjugada, lo que permite que la enzima E2- conjugada forme un complejo con la enzima E3-ligasa. Una vez que se ha formado el complejo, tiene la capacidad de transferir la molécula de ubiquitina a la proteína diana, este proceso se produce varias veces para formar la cola de poliubiquitina en la proteína. Cuando finaliza la adición de la cola, esta proteína será reconocida por el proteosoma para su degradación (Figura 1) (Soucy et al, 2010; Xirodimas, 2008).



**Figura 10:** Descripción del proceso de ubiquitinación (Soucy et al, 2010).

La ubiquitinación es un proceso caracterizado ampliamente, sin embargo, se han descrito varias cascadas enzimáticas homólogas con ocho clases diferentes de proteínas tipo ubiquitina. Estas proteínas están relacionadas estructuralmente con la ubiquitina y con la formación de conjugados similares para una gama amplia de sustratos mediante enzimas E1 y E2. Una de las proteínas es NEDD8, la cual tiene un 80% de homología con la ubiquitina y se ha descrito que desempeña un rol crítico en la activación de la E3-ubiquitina ligasa (llamadas Ring ligasas de culina). Por lo tanto, la NEDDilación es un proceso importante para la actividad de la E3 ligasa, ya que esta es la responsable de la ubiquitinación de múltiples proteínas, varias de las proteínas que están involucradas en la regulación de la función celular normal, la progresión y la supervivencia del ciclo celular (Xirodimas, 2008).

Teniendo en cuenta que NEDD8 regula la actividad de las RING ligasas de culina, y que estas son las responsables de la ubiquitinación de diferentes proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular en el cáncer, es relevante establecer un enfoque terapéutico. Este enfoque está centrado en un inhibidor de la NEDDilación MLN4924, el cual se ha visto que actúa sobre tumores dependiente de la ruta de NF- $\kappa$ B para la supervivencia, por lo que la inhibición de la NEDDilación tiene potencial como alternativa para el tratamiento contra el cáncer (Zhang et al, 2016; Godbersen et al, 2015).

### **Línea Celular MEC-1**

La obtención de líneas celulares a sido crucial para comprender ciertos mecanismos biológicos de neoplasias malignas de células B. Es así como se originó la línea celular MEC-1, la cual esta derivada de la sangre periférica de un paciente con LLC que además es positivo para el virus Epstein-Bar (EBV) en etapa temprana de transformación prolinfática. Asimismo, presentaba una etapa pre agresiva de LLC y una expresión negativa de CD5 (Alpay et al, 2016). Una característica particular las células MEC-1, es que tienen una sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica BCL-2, protegiéndolas de la apoptosis (Stacchini et al, 199; Rasul et al, 2014).

### **Datos Previos**

Según los datos previos que se obtuvieron en el laboratorio a partir del estudio de la NEDDilación, MMP-9 es uno de los fuertes candidatos que estaría regulado por NEDDilación en la LLC, lo cuál se corroboró a través del estudio del efecto del MLN4924 en células B primarias de pacientes con LLC. Además, se determinó que regula rutas como NF-kB y AP1, por lo que están implicados genes diana de estas rutas. Para continuar la línea de investigación se busca determinar el mecanismo molecular por el cuál la NEDDilación modula la expresión de MMP-9, ya que en células B-CLL primarias, MLN4924 reprime su expresión. Para ello se empleó la línea células MEC-1 como modelo de estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo Celular

#### 1.1. Líneas Celulares

Se descongeló las líneas celulares de las alícuotas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su cultivo en el medio correspondiente. Las células crecieron hasta su adherencia a la superficie de la placa o hasta que proliferaron correctamente para las células en suspensión.

Para la realización de este trabajo se empleó diferentes cultivos de líneas celulares que se describen a continuación en la tabla 1:

**Tabla 1:** Listado de líneas celulares empleadas en el estudio.

Línea Celular	Descripción	Medio de cultivo
293T	Células adherentes de riñón embrionarias de humano, que expresan una versión mutante del antígeno T.	DMEM High Glucose (Biowest, ref: L0103-500) +FBS (Europe, ref: F135EV500) +PS (Peniculin streptomycin, Gibso. Ref: 15070-063).
MEC	Células en suspensión que muestran la evolución subclonal de la enfermedad de la LLC (Linfoblastos B inmortalizados). Donadas de Dolores Delgado del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Cantabria (IBBTEC).	RPMI 17édium (Biowest, ref. 52400-025) +FBS (Europe, ref: F135EV500) +PS (Peniculin streptomycin, Gibso. Ref: 15070-063).
HS5	Células adherentes de linfoblastos B del estroma.	DMEM High Glucose (Biowest, ref: L0103-500) +FBS (Europe, ref: F135EV500) +PS (Peniculin streptomycin, Gibso. Ref: 15070-063).

#### 1.2. Extracción mediante Gradiente de Ficol

Para la obtención de monoclonales de pacientes con LLC, se realizó el procesamiento de la muestra de sangre periférica. Se preparó 3 tubos falcón, en el tubo 1 se colocó la sangre periférica y diluyó la muestra añadiendo el mismo volumen de PBS (Puffertabietten, Paricea Applied, ref: A9202-0010). Seguidamente, en el tubo 2 se añadió Ficol (Ficoll Paque™

Plus, GE Healthcare, ref: 17-1440-02) y se colocó lentamente al tubo 1 de sangre diluida, se centrifugó a 1700rpm/ 30 minutos permitiendo que se forme 3 fases, lo que facilita el aislamiento únicamente células monoclonales.

En el tubo falcón 3 se extrajo la fase turbia donde se encuentran las células mononucleares que se generan después de la centrifugación. Se añadió PBS para el lavado de las células mononucleares y se centrifugó a 1700/10 minutos y se cambia el PBS en cada lavado, considerando que son de 3 lavados.

Finalizados los lavados el pellet se resuspendió en el medio RPMI m+ FBS + PS para el cultivo o por el contrario se resuspendió directamente en de TriReagent (Molecular Research Center Inc, ref: 513-841-0900-888-841) para extracción directa de RNA, dependiendo del experimento que se planteaba.

Una vez establecido el cultivo a de las líneas celulares presentadas previamente en la tabla 1 y los monoclonales de pacientes con LLC, se plaqueó en dependencia al numero de experimentos. Entre los experimentos que se plantearon se podía proseguir con los siguientes procedimientos:

### 1.3. CoCultivo

Para la determinación de la interacción microambiental se planteó el cocultivo entre MEC-1 y HS5, para ello se estableció inicialmente el cultivo de las células HS5 hasta que se adhieran a la superficie. De igual manera, las células MEC-1. Posteriormente se plaqueó en frascos de HS5, y se incubó por 3 días hasta que crecieron por toda la superficie. Transcurrido el tiempo se cultivo las MEC-1 en los frascos que contenían las HS5 con el tratamiento correspondiente y se incubó por 24h. Pasadas las 24 horas se recogió únicamente las MEC-1 para el análisis de RNA.

## 2. Tratamiento con Fármacos

Para determinar el efecto y las rutas de intervención se empleó tratamientos a las células MEC-1 con diferentes inhibidores, aunque nos enfocamos especialmente en MLN4924 dirigido a la NEDDilación. Se incubó a las células en diferentes inhibidores y varias concentraciones como se muestra a continuación en la tabla 2:

**Tabla 2:** Detalle de inhibidores empleados para tratamiento en células MEC-1.

Fármaco	Concentración	Tiempo
MLN34	0,0025mM/ $\mu$ l	24 o 40 horas
	0,025mM/ $\mu$ l	
	0,25mM/ $\mu$ l	
Ideralisib	1 mM / $\mu$ l	24 horas
	10 mM / $\mu$ l	

Forskolina	1 mM / $\mu$ l	
	10 mM / $\mu$ l	24 horas
	30 mM/ $\mu$ l	
IL-1B	10 mM / $\mu$ l	24 horas
Bortezomib	0, 1 mM / $\mu$ l	
	1 mM / $\mu$ l	24 horas

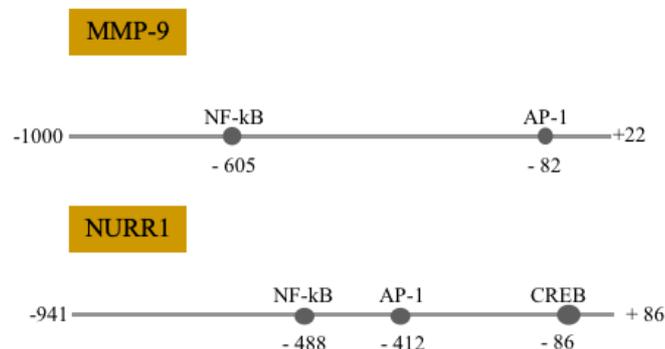
**Nota:** Tomando en cuenta la solución de dilución de cada inhibidor se empleó DMSO o agua estéril como control.

### 3. Transfección

La transfección se empleó para determinadas construcciones según las regiones de los promotores que se detalla en la figura 11, por cuanto se analizó la expresión estos en células 293T por su facilidad al transfectar, que no se obtuvieron en MEC-1.

Una vez plaqueadas las células en placas de 6 pocillos, si han adherido o adaptado los suficiente se hace la transfección química por el método de precipitación con Fosfato Cálculo. Basado en la formación de un precipitado entre al cloruro cálcico  $\text{CaCl}_2$  y el DNA en solución salina. Para ello, se preparó las diluciones en agua destilada de los plásmidos de expresión pertinentes, a las cuales se les añadió una solución de  $\text{CaCl}_2$  (tubo A). Posteriormente, se añadió a un tubo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y HN (tubo B). Se dejó caer gota a gota el tubo A sobre tubo B para que se formen los agregados y se añadieron gota a gota lentamente en cada pocillo, se dejó actuar hasta el siguiente día para que la célula incorpore los agregados. Finalmente, se renueva el medio de cultivo y se incuba la placa por 24 horas hasta que se genere la expresión de los plásmidos en las células.

Transcurrido el tiempo se recogen los experimentos en TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, EEUU) para la extracción y análisis de RNA o PBS para análisis de proteína mediante Western Blot, Zimografía, o Luciferasa.



**Figura 11:** Regiones promotoras de MMP-9 y NURR1 empleadas en la transfección.

#### 4. Determinación de Expresión Génica:

Para determinar la expresión de MMP-9 tanto a nivel transcripcional como proteico se emplearon las siguientes técnicas:

##### 4.1. Análisis de RNA

###### 4.1.1. Extracción de RNA

En la muestra con TriReagent, se añadió cloroformo (alcohol isoamilco) (24:1). Posteriormente, se centrifugó a 1400rpm/15 minutos, permitiendo que se separen en dos fases, se recogió la fase acuosa donde esta el RNA. Seguidamente, se añadió isopropanol para precipitar el RNA y se lavó con Etanol al 80% en agua DEPC: Water RNase free (Fisher Bioreagents, ref: BP561-1) para eliminar sales y se centrifugó 1400rpm/20 minutos a 4°C. Finalmente, se descarta el sobrenadante y se deja secar hasta eliminar el exceso de etanol, el pellet se resuspendió en agua DEPEC y se almacena a -80°C.

###### 4.1.2. Retrotranscripción

El RNA obtenido se cuantificó en el equipo Nanovue Plus Spectrophotometer, GE Helthacare. Una vez que se obtuvo la concentración se realizó una estandarización de las muestras, con un volumen final de 11,5 µl.

La retrotranscripción se realiza en dos pasos:

**Tabla 3:** Detalle de la reacción de síntesis de cDNA.

<p>A) <u>Reacción de desnaturalización:</u></p> <p>A la dilución previa de RNA, se añadió la mezcla conformada por Random Hemamer (Invitrogen, ref: N8080127) y dNTPs (Invitrogen, ref: N8080260) a cada muestra y se llevó a cabo la desnaturalización el RNA en el termociclador. Inmediatamente se produjo shock térmico para mantener separadas las cadenas de RNA.</p>	<p>B) <u>Reacción de síntesis de cDNA:</u></p> <p>Mientras las muestras estan el hielo se añade la mezcla de síntesis de cDNA conformado por Buffer (ThermoFisher, ref:18057018), DTT (Dithiothreitol, Invitrogen, ref: D1532), RNAin (Invitrogen, ref: N8080119), RT SIII SS (Invitrogen, ref: 18080044), se lleva nuevamente al termociclador par que se lleve acabo el proceso.</p>
---	--

###### 4.1.3. RT-PCR

En cada experimento se determinó los cambios en la expresión a partir de las muestras obtenidas de cDNA, donde se amplificaron los genes de interés detallados en la tabla 4.

**Tabla 4:** Lista de cebadores empleados en el análisis de expresión.

Cebador	Secuencia
GAPDH	Fw: GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTC
	Rv: CGGCCATCACGCCACAGTTTC
B-ACTINA	Fw: GCGGGAAATCGTGCGTGACATT
	Rv: GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG
MMP-9	Fw: TTCAGGGAGACGCCCATTTTC
	Rv: TGGGTGTAGAGTCTCTCGCT
MCL-1	Fw: CTTCGGGAGCAGGCCAC
	Rv: AGGTTGCTAGGGTGCAACTC
BCL-2	Fw: GGATAACGGAGGCTGGGATGCC
	Rv: TTGGGGCAGGCATGTTGACTTCAC
NURR1	Fw: CTGTAACTCGGCTGAAGCCAT
	Rv: AGGGGCATTTGGTACAAGCA
TANK	Fw: GCAGCATTGTTAGAGCCTGT
	Rv: AAGCAGAGGAACACAGCCAT
XIAP	Fw: TGGCAATATGGAGACTCAGC
	Rv: TGCACTTGGTCACCAATACC
BCL-XL	Fw: GGCAACCCATCCTGGCACCT
	Rv: AGCGTTCCTGGCCCTTTTCG

El programa de amplificación estuvo basado en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 95°C, 30 segundos, continuando con 25 o 30 ciclos (dependiendo del gen) a 57°C, 45 segundos y 72°C, 1 minuto, seguido de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2% dependiendo del tamaño del fragmento teñido con bromuro de etidio, la detección se realizaba en el foto-documentador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System, Bio-Rad. Los datos de cada uno de los genes fueron ingresados en la base de datos correspondiente.

#### 4.1.4. RT-qPCR

A partir de las muestras de cDNA, se realizó una dilución en proporción 1:10 con agua destilada y se añadió en la placa cada muestra por triplicado. Para preparar la mezcla se añadió los cebadores, SYBR™ GREEN PCR Molecular Max (Applied Biosystems, ref:4309155) y agua destilada. Se programó en el equipo 7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, el proceso inicia con: 95°C (10 minutos), 95°C (30 segundos), 57°C (30 segundos), 72°C (1

minuto). Durante 40 ciclos y en la curva de disociación 95°C (15 segundos), 60°C (30 segundos) y 95°C (15 segundos).

La reacción se basa en la lectura del fluoróforo SYBER Green, el cual se unirá específicamente a doble cadena del DNA permitiendo que el sistema de PCR sea capaz de detectar en tiempo real la cantidad de fluorescencia que es producida en cada ciclo de PCR. Al finalizar la lectura, el software indica una gráfica de fluorescencia que representa el número de moléculas en cada ciclo y cómo estas varían a lo largo de la reacción.

## 4.2. Análisis de Proteína

La proteína se analizó por dos diferentes metodologías Western Blot y Zimografía, que se detallan a continuación.

### 4.2.1. Western Blot

#### 4.2.1.1. Extracción de proteína

Una vez que obtuvo el pellet de las células de los experimentos ya sea de transfección o de tratamiento con inhibidores. Se llevó a cabo el proceso de lisis celular con la solución buffer EBC conformado por Tris pH=7,4, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 10% Glicerol, 0,7% NP40 al cuál se le agregaron los inhibidores de proteasas, NaF, 1M Ortovanadato, DTT (Dithiothreitol, Invitrogen, ref: D1532), Aprotinina, Leupeptina (Sigma, ref: MFCD00037012), 100mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, ref: 1190905L) y  $\beta$ -glicorofosfato (Sigma, ref: 24895383). Se dejó lisando por aproximadamente 60 minutos y se obtuvo el sobrenadante que contiene las proteínas.

#### 4.2.1.2. Cuantificación de Proteína

Para la cuantificación se preparó un patrón de BSA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, ref: 224B-B). Seguidamente se cargaron las muestras por duplicado y se añadió en cada una la mezcla de reactivo BCA (Bichinchoninic Acid Protein Assay Kit, Biosciences, ref: 586-760), se dejó reaccionar por 30 minutos. Finalmente, se procedió la lectura en el espectrofotómetro Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific Inc). El BCA reacciona al contacto con la proteína permitiendo la detección de la concentración por espectrometría.

#### 4.2.1.3. Preparación del gel de Acrilamida

Se ensambló la matriz para los geles de acrilamida, y se preparó una mezcla de agua destilada, Acrilamida al 30%, 1,5M Tris (pH=8,8), 10% SDS, 10% APS (Amonio persulfato, Sigma, ref: A3678-106) y TEMED (Tetramethylethylene-diamine, Sigma, ref: 058K1152). El porcentaje del gel de separación varía, teniendo en cuenta el peso de la

proteína de interés, y para el gen de carga se mantiene las cantidades para un porcentaje de 5%. Primero se carga el gel de separación y posteriormente el gel de carga.

#### 4.2.1.4. Preparación de la muestras

En función a la concentración de proteína obtenida previamente, se agregó la cantidad necesaria, y se añadió una mezcla de loading buffer + 10% de DTT. Se incubó a 95°C durante 5 minutos y se centrifugó a 1400rpm/1minuto.

#### 4.2.1.5. Electroforesis

Los geles verticales en la cubeta de BioRad se cubieron de tampón de electroforesis conformado por tampón Tris-Glicina 1X + 10% SDS y agua destilada. Se cargaron las muestras con el respectivo marcador de peso molecular y se corrieron a 120V y 300mA por aproximadamente una hora.

#### 4.2.1.6. Transferencia

Para transferir las proteínas del gel de acrilamida a la membrana BioTrace PVDF de 0.45µm (Pall Corporation). Se colocó tampón de transferencia (tampón Tris-Glicina 1X+ Metanol + agua destilada) y se preparó una estructura de soporte para mantener el contacto del gel de acrilamida con proteínas y la membrana. Seguidamente, en la cubeta de electroforesis BioRad se colocó los soportes con un bloque de hielo, para la transferencia con condiciones de 120V y 360mA durante 50 minutos.

#### 4.2.1.7. Tramiento de la membrana

Cuando la transferencia ha finalizado, se desmonta la estructura manteniendo únicamente la membrana, esta se colocó en una cubeta donde se realiza 3 lavados de agua destilada, mientras tanto se mantiene en agitación a temperatura ambiente. Después de los lavados se bloquea la membrana con la solución de bloqueo Tropix I- Block (Applied Biosystems, ref: T2015) durante 1 hora.

Al finalizar el bloqueo se incubó la membrana con el anticuerpo primario (GAPDH, BCL-2, MMP-9, MCL-1) que corresponda en función a la proteína de estudio. El anticuerpo primario se diluyó en solución de bloqueo en función de la concentración que se plantea (1:250, 1:500, 1:1000) y se incubó con la membrana en agitación durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, se colocó la membrana en agitación a temperatura ambiente, una vez atemperada la membrana se realizan lavados con buffer TBS (NaCl, Tris, TWEEN 20 y agua destilada) en agitación. Después de los lavados, se incubó la membrana a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, Mouse ref: sc-51612, Rabbit ref: sc-2347, Goat ref: sc-2768) en solución de bloqueo por 1 hora.

Seguidamente de la incubación, se realizó lavados con buffer TBST en agitación y se procedió a revelar la membrana con reactivo SuperSignal West Dura (Thermo Scientific, ref: 34076). La membrana permaneció en contacto con solución durante 5 minutos, y finalmente se visualizó mediante el sistema de análisis de imagen luminiscente automático ImageQuant LAS4000 Mini, General Electric Company.

Después del proceso de revelado, se colocó la membrana en la cubeta con TBST, y se hizo lavados con agua destilada en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió la solución de Stripping (Glicina, 1mM EDTA, 10% SDS y agua destilada) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se hizo un lavado con agua destilada y con TBST en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió la solución de bloqueo durante una hora en agitación a temperatura ambiente, para comenzar nuevamente el proceso de incubación con el anticuerpo primario.

#### 4.2.2. Zimografía

Este procedimiento se empleó para la determinación de la expresión de la proteína secretada en el medio. Para ello del cultivo de las células, se recogió el sobrenadante y se añadió glicerol para preservar las proteínas. Paralelamente se preparó un gel de acrilamida conformado por gel de separación (varía según el peso de la proteína) y gel de carga (normalmente al 5%). El gel se carga verticalmente en la cubeta de BioRad y se cubrió completamente con buffer de electroforesis (70 ml tampón Tris-Glicina 1X + 10% SDS hasta 350ml de agua destilada). Al sobrenadante obtenido se le añadió la muestra + loading buffer 5X, se incubó a 95°C por 5 minutos y se centrifugó a 1400rpm/3 minutos a 4°C. Se cargó las muestras en el gel con el correspondiente marcador de peso molecular y se corrió por aproximadamente 1 hora. Transcurrido el tiempo se colocó el gel de acrilamida en una cubeta y se hicieron lavados de 30 minutos con buffer tritón y uno con agua destilada. Posteriormente, se dejó toda la noche en buffer de incubación (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, 50mM Tris) a 37°C tapado. Al siguiente día se reveló con solución coomasie (Coomassie® Brilliant blue G 250-Sigma, ref: 6104-58-1+ Etanol+ Ácido acético) durante aproximadamente 1 hora, luego se hicieron lavados con buffer tritón cambiando periódicamente hasta que se aclaren las bandas y se visualicen las proteínas. Finalmente se analizó los resultados.

## 5. Luciferasa

El ensayo de luciferasa nos permitió determinar la expresión de las construcciones en las células 293T transfectadas previamente. Este ensayo nos permite medir la cantidad de luz generada en la reacción enzimática catalizada por la Luciferasa. Posterior a la transfección se recogieron las células en PBS y por centrifugación se obtuvo únicamente el pellet de células.

El pellet se resuspendió la solución de lisis de Pierce™ Luciferase Cell Lysis Buffer (2X) (Thermo Scientific), se dejó actuar por un par de horas en hielo y se centrifugó a 1400rpm /5 minutos para obtener el sobrenadante. En una placa, se cargó las muestras por duplicado para la lectura de Luciferasa y Galactosidasa. Posteriormente, para determinar la galactosidasa se añadió solución Galacto-Light Plus™ β-Galactosidase Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, ref: T2116) + buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM) y se dejó actuar por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Mientras tanto, se procedió con la lectura la de luciferasa con el reactivo Luciferasa (Promega, ref: E1500) en el equipo Luminoskan Ascent (Thermo Scientific) donde mediante la inyección de luciferina se genera la reacción de emisión de luz que es captada por el luminómetro. Estos valores se relativizaron con la lectura de galactosidasa que una vez transcurrido el tiempo mediante el mismo proceso de inyección de Tropix Acelertor II (Applied Biosystems, ref: T222). Posteriormente se analizaron los datos de expresión obtenidos.

## 6. Clonajes

En el proyecto se planteó el estudio de BTK y 14-3-3z como parte de investigación por lo que se realizó el clonaje de estas dos proteínas mediante el siguiente protocolo:

### 6.1. Preparación del inserto y vector

A partir de una muestra de cDNA humano se amplificó el fragmento determinado en función del gen o la proteína de estudio, esto se conseguía siguiendo el protocolo de RT-PCR y visualización de los productos de PCR mencionado anteriormente. El fragmento se purificó directamente de la PCR o del gel de agarosa mediante el kit comercial (E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit, Omega, ref: D2500-02), seguidamente se realizaba el corte enzimático a 37°C por aproximadamente 1 hora, teniendo en cuenta cual es el buffer más adecuado para la acción de las enzimas.

Al mismo tiempo, se seleccionaba el vector de expresión que en ocasiones debía ser eliminado el inserto o únicamente realizar los cortes con enzimas para que sea a fin al corte del fragmento.

Una vez listo el vector y el inserto se procedía a ligar por aproximadamente 16 horas a 16°C en el termociclador, finalizada la ligación se mantenía a -4°C hasta la transformación.

### 6.2. Transformación Bacteriana

Se descongeló una alícuota de bacterias DH5alfa (ThermoFisher Scientific, ref: 18265017) de 50µl en hielo, para que se descongelen lentamente. Seguidamente, se añadió la ligación y se resuspendió, se incubó por 30 minutos en el hielo. Transcurrido el tiempo, se colocó 20 segundos a 37°C y se pasó inmediatamente al hielo generando el shock térmico que

permitirá el ingreso del plásmido en las bacterias, luego se añadió 300µl de medio de cultivo LB (LB Broth, Fisher, ref: 9723-500). Posteriormente, se incubó el tubo a 37°C, y finalmente se plaqueó en un LB AGAR (ApplieChem, ref: A7459) con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido (temperada previamente), esparciendo por toda la placa con un asa estéril favoreciendo el crecimiento espaciado de colonias. Finalmente se incubó la placa a 37°C por 24 horas.

Una vez que se formaron las colonias en la placa, se eligió 10 colonias aleatoriamente y se creció minipreps en LB con el respectivo antibiótico. Además, se marcó 10 cuadrantes en otra placa con antibiótico donde se picó cada colonia para las réplicas. Las minipreps se dejan crecer por 24 horas.

Para la extracción de DNA, se dispensó el medio en ependorf y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos obteniendo el pellet de bacterias. Se descarta el sobrenadante y se procede según el protocolo de extracción kit comercial (E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit, Omega, ref: D6922-44).

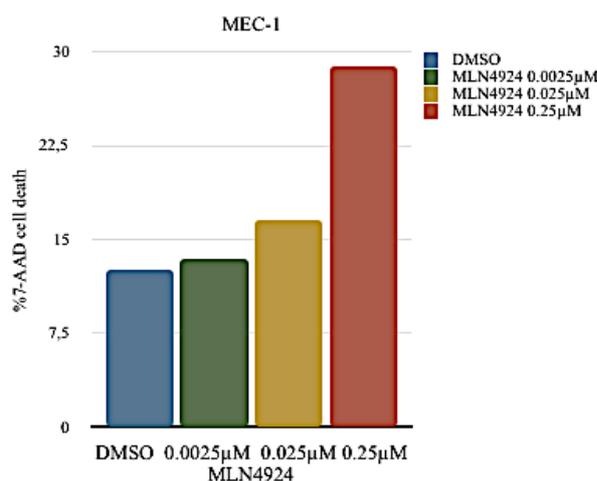
### 6.3. Comprobación de clonaje

Para comprobar que las colonias integraron a su DNA el vector con el inserto, se realizó cortes con enzimas de restricción o PCRs para amplificar las regiones específicas. Se comprueba que en los fragmentos obtenidos sean del tamaño correspondiente en todas las colonias, se seleccionó las colonias positivas para obtener mayor cantidad del plásmido y se comprobó mediante secuenciación que el inserto este en la dirección correcta y que esta corresponda a la proteína o gen planteado.

## RESULTADOS

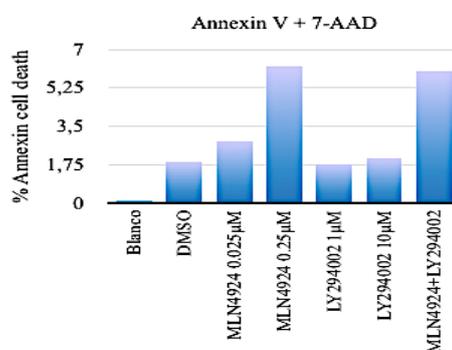
### Efecto de MLN4924 sobre la viabilidad de células MEC-1

Para analizar el efecto de la NEDDilación en las células MEC-1, se aplicó un tratamiento a concentraciones de MLN4924 crecientes en las células a 24h y 40h. El marcaje celular con 7-AAD analizado por citometría de flujo mostró que en cuanto mayor era la concentración de MLN4924 había un incremento en la muerte celular (Ver Gráfica 1).



**Gráfica 1:** Marcaje de muerte celular a dosis crecientes de MLN4924 en MEC-1.

Datos de otros grupos y del nuestro han demostrado un efecto sinérgico de MLN4924 con inhibidores de la ruta PI3K en linfocitos B-LLC primarios (Godbersen et al, 2014). Quisimos analizar si esta sinergia se producía también en las células MEC-1. Para ello tratamos las células MEC-1 con MLN4924, solo o en combinación con el inhibidor de PI3K, LY294002. Tras 24h de tratamiento, estudiamos la apoptosis de las células mediante marcaje de Annexina-V y la viabilidad celular mediante marcaje con 7-AAD y posterior análisis por citometría de flujo. MLN4924 indujo muerte celular por apoptosis de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre en células B-LLC primarias, LY294002 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células MEC-1. (Ver Gráfica 2).

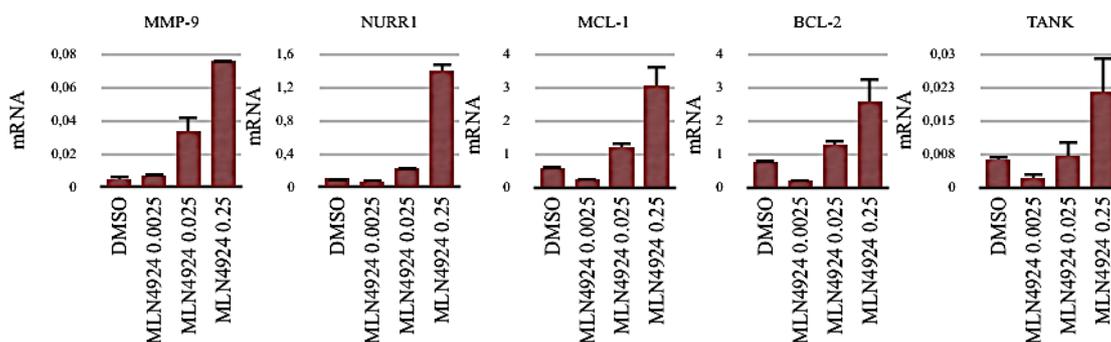


**Gráfica 2:** Muerte celular y muerte apoptótica en MEC-1 a dosis crecientes de MLN4924.

### Influencia de MLN4924 sobre la expresión génica en células MEC-1

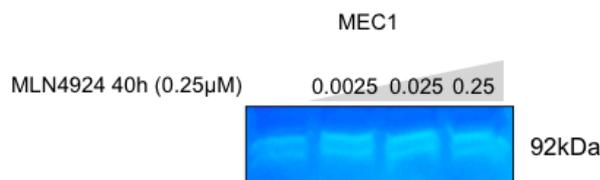
Datos previos del grupo revelaron que la inducción de apoptosis en linfocitos B-LLC primarios por MLN4924 iba acompañada de una disminución en la acumulación del mRNA de MMP9. Analizamos si esta observación se reproducía también en células MEC-1.

Estudiamos el efecto del MLN4924 sobre la expresión de MMP-9 y genes involucrados en la vía de NF-kB en células MEC-1. Se observó un incremento en la expresión de los genes MMP-9, NURR1, Mcl-1, Bcl-2 y Tank conforme aumenta la concentración del inhibidor (Ver Gráfica 3).



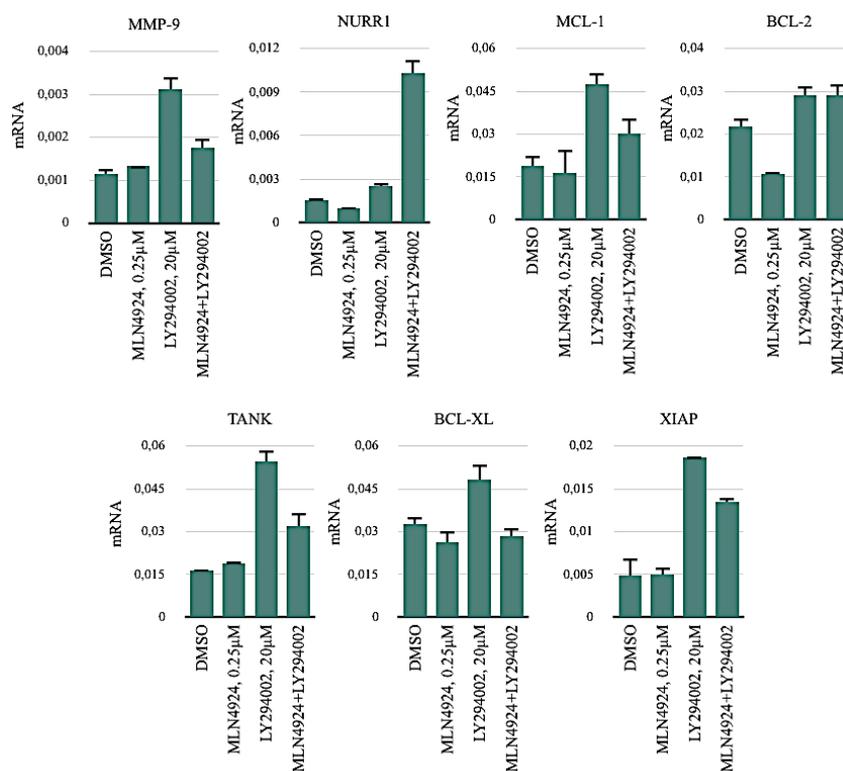
**Gráfica 3:** Análisis de expresión de MMP-9, NURR1, MCL-1, BCL2, TANK después de tratamiento con MLN4924 en MEC-1.

Para tratar de establecer si la sobreexpresión del gen de MMP-9 correlacionaba con un aumento de la producción o la secreción de la proteína, analizamos extractos proteicos de células MEC-1 mediante western blot. Desafortunadamente, el anticuerpo utilizado no fue capaz de detectar la proteína en este tipo de ensayo. El análisis del medio de cultivo de células MEC-1, sin embargo, sí detectó actividad gelatinasa, cuya actividad se vio ligeramente incrementada por el tratamiento con MLN4924 (Ver Figura 12)



**Figura 12:** Visualización mediante Zimografía de MMP-9 después de tratamiento con MLN4924 en MEC-1.

El análisis del efecto del MLN4024 y Ly294002, solos o en combinación, sobre la expresión de MMP-9 se determinó que el MLN4924 revierte el efecto activador de LY294002. Este mismo efecto se observa en Mcl-1, Tank, Bcl-xl y Xiap. Sin embargo, en NURR1 se observa el efecto contrario MLN4924 potencia el efecto de Ly294002 y en Bcl-2 no tiene efecto alguno (Ver Gráfica 4).



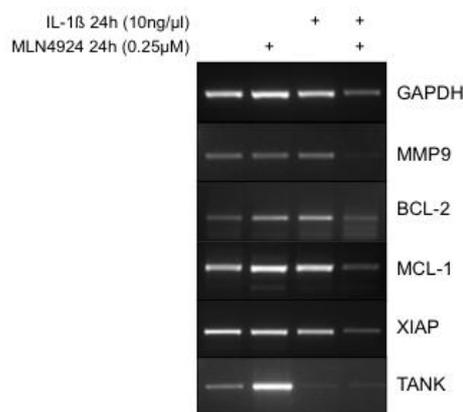
**Gráfica 4:** Análisis de MMP-9, NURR1, MCL-1, BCL-2, TANK, BCL-XL, XIAP en tratamiento de combinación de MLN4924 + LY294002 en MEC-1.

### Estudio del efecto de MLN4924 sobre las rutas reguladoras de MMP-9

Se ha documentado que la transcripción de MMP-9 está principalmente regulada por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Ringshausen et al, 2004), por lo que decidimos estudiar el efecto de MLN4924 sobre la funcionalidad de estos factores en células MEC-1. Además, se ha reportado un efecto inhibitor de NURR1 sobre la expresión de MMP-9 (Mix et al, 2007).

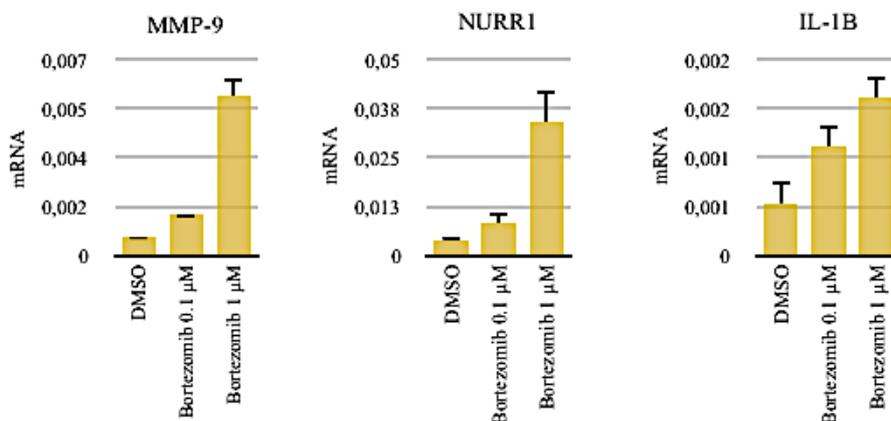
#### Ruta NF- $\kappa$ B

Para determinar el papel de la ruta NF- $\kappa$ B en la expresión de MMP-9 en células MEC-1 y la posible influencia que sobre ella pueda tener la NEDDilación, tratamos células MEC-1 con interleuquina 1 $\beta$ , un conocido inductor de la ruta NF- $\kappa$ B, con MLN4924 o la combinación de ambos. En la Figura 12 se puede observar como el tratamiento con IL-1 $\beta$  induce tímidamente la expresión de Bcl-2 en células MEC-1, pero no produjo un efecto claro sobre la expresión del mensajero de MMP-9 (Ver Figura 13).



**Figura 13:** Análisis de PCR semi-cuantitativa de la expresión de MMP-9, BCL-2, MCL-1, XIAP y TANK después del tratamiento con IL-1  $\beta$  en MEC-1.

La ruta NF- $\kappa$ B está fuertemente regulada a través de una proteína inhibidora, I $\kappa$ B, que debe de ser degradada en el proteosoma para que el factor NF- $\kappa$ B pueda ejercer su función. Así, decidimos estudiar el efecto que la inhibición del proteosoma tiene sobre la expresión de MMP-9 en células MEC-1. El tratamiento de las células MEC-1 con dos concentraciones diferentes de bortezomib, un inhibidor del proteosoma ampliamente utilizado en clínica, produjo una inducción de la expresión de MMP-9 de forma dependiente de la dosis. Algo similar ocurrió con la expresión de los genes NURR1 e IL-1 $\beta$  (Ver Gráfica 5).

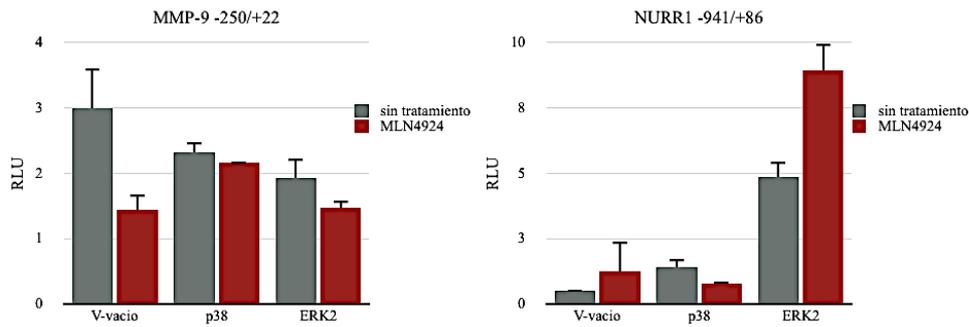


**Gráfica 5:** Análisis de MMP-9, NURR1 e IL-1 $\beta$  en tratamiento de combinación Bortezomib en MEC-1.

#### Ruta AP1

Investigaciones previas indicaban un papel del factor de transcripción AP-1 en la activación del promotor de MMP-9. El elemento de respuesta a este factor de transcripción se localiza en la posición -82 respecto al inicio de la transcripción del gen. La función de los dos componentes del factor AP-1, las proteínas c-fos y c-jun, es modulada mediante fosforilación por diferentes MAPK. Para estudiar el efecto de dos de estas MAPK sobre la activación del promotor de MMP-

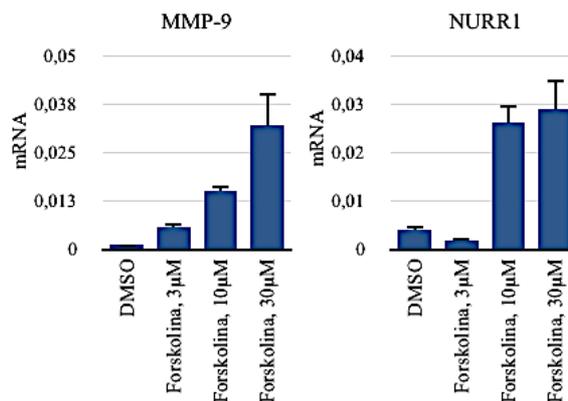
9, realizamos un ensayo luciferasa con un fragmento de la región reguladora del gen entre las posiciones -250 y +22. La cotransfección en 293T tanto de p38 como de ERK2 indujo una ligera represión de la actividad basal de esta región. Sin embargo, lo más llamativo fue que la cotransfección de las dos kinasas bloqueó el efecto inhibitorio de MLN4924 sobre su actividad. En paralelo analizamos la actividad del promotor de NURR1. La actividad de la región reguladora entre las posiciones -941 y +86 de este promotor se indujo por p38, pero sobretodo por ERK2. La inhibición de la NEDDilación revirtió el efecto de p38 pero potenció el de ERK2 (Ver Gráfica 6).



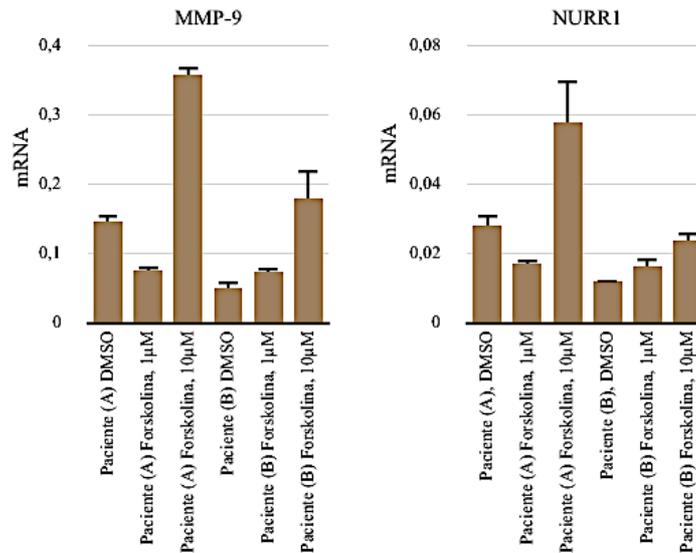
**Gráfica 6:** Análisis de la expresión de MMP-9 y NURR1, en la cotransfección y el tratamiento con MLN4924 en células 293T.

#### Efecto de PKA y NURR1

Datos previos del grupo han demostrado que el receptor huérfano NURR1 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de MMP9, en células primarias B-LLC. Por lo tanto, estudiamos el efecto de la Forskolina sobre MMP-9 y NURR1 en las células MEC-1 y en células primarias B-LLC. Se observó que conforme aumenta la concentración del inhibidor la expresión de los genes incrementa tanto en células primarias B-LLC y las células MEC-1(Ver Gráfica 7 y 8).

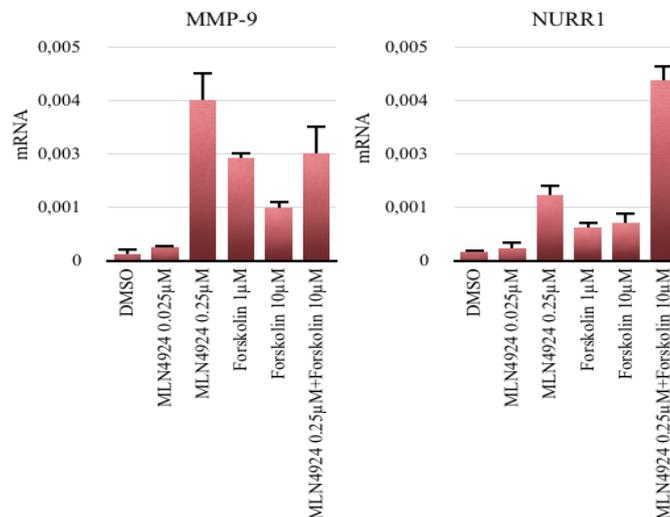


**Gráfica 7:** Análisis de la expresión de MMP-9 y NURR1 en el tratamiento con forskolina en MEC-1.



**Gráfica 8:** Análisis de la expresión de MMP-9 y NURR1 en tratamiento con forskolina en células B-LLC.

Analizamos entonces el efecto del MLN4924 sobre la inducción de PKA. Mientras que forskolina y MLN4924 parecen tener un efecto sinérgico sobre la transcripción de NURR1, no parece que este sea el caso con MMP-9 (Ver Gráfica 9).

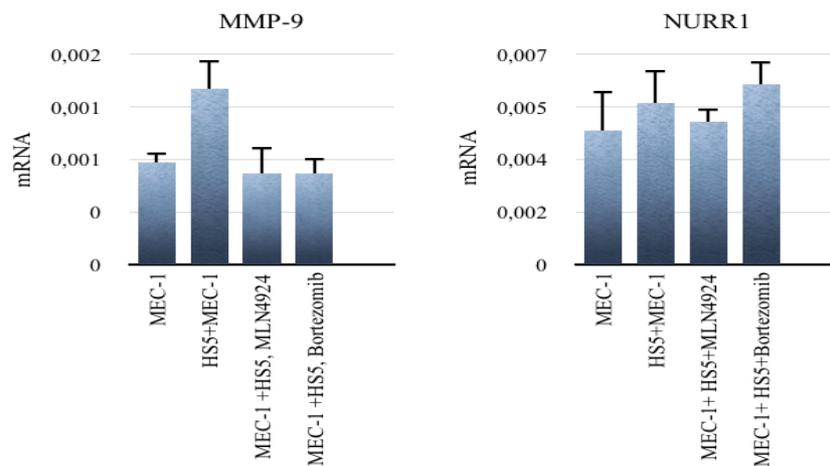


**Gráfico 9:** Análisis de la expresión de MMP-9 y NURR1 en la combinación de MLN4924 + Forskolina en MEC-1.

### Intervención del estroma sobre las células MEC-1

En la LLC la influencia del estroma es importante, debido a que estas células pueden generar señales que activen ciertas rutas de supervivencia. MMP-9, además de que por los propios linfocitos B-LLC es secretada por las mismas células del estroma mesenquimatoso (MSC),

células derivadas de monocitos (NLC), las células dendríticas foliculares (FDC) y las células T. Por lo tanto, se estudió el efecto que la interacción con el estroma tiene sobre la expresión de MMP-9 en la LLC y el papel que la NEDDilación desempeña en ello. Utilizamos las células MEC-1 como modelo de LLC y las cocultivamos con células de estroma inmortalizadas, HS-5. El cocultivo con células HS-5 indujo la expresión de MMP-9 en células MEC-1. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el mensajero de NURR1. Para tratar de determinar si la ruta NF- $\kappa$ B participaba en la inducción de MMP-9, añadimos Bortezomib al cocultivo, y comparamos su efecto con el de MLN4924. Tanto Bortezomib como MLN4924 revirtieron la inducción de MMP9 por el cocultivo con células HS-5 (Ver Gráfica 10).



**Gráfica 10:** Análisis de expresión de MMP-9 y NURR1 después de tratamiento con MLN4924, Bortezomib en cocultivo de MEC-1+ HS5.

### Obtención de clonajes

El clonaje de BTK y 14-3-3z fueron obtenidos y comprobados, sin embargo no fueron empleados en esta investigación. Por lo que serán empleadas en el grupo para futuras investigaciones en el laboratorio continuando con la línea de NEDDilación y la relación de estas proteínas.

## DISCUSIÓN

Aunque la ciencia ha logrado grandes avances en los últimos años en la detección y tratamiento de la LLC, esta continúa siendo una enfermedad incurable, llegando a ser mortal. Por lo que es imperativo la búsqueda de tratamientos innovadores y dianas terapéuticas con mayor efectividad, para comprender en mayor medida esta enfermedad. En virtud de ello, en esta investigación se llevo cabo con el fin de aportar datos sobre el papel de la NEDDilación en la etiología y pronóstico de la LLC. El tratamiento con MLN4924 actuó eficientemente en la inducción de la apoptosis en las células MEC-1, no obstante, Ly294002 no mostró tal efecto.

Por otro lado, en el análisis de expresión se demostró que los niveles de expresión del mensajero de MMP-9, y genes involucrados en la supervivencia celular como Mcl-1, Bcl-2, NURR1, Tank, Bcl-xl y Xiap, incrementaron su expresión conforme aumentaba de la concentración de los inhibidores en cada uno de los tratamientos en las células MEC-1. Por lo que, aunque la apoptosis celular se evidenció claramente, el incremento de la expresión en función a la concentración del fármaco nos lleva a descartar el carácter antiapoptótico de MMP-9, tanto por la ruta de NF-kB como PI3K. En lo referente a forskolina, se determinó el mismo patrón de expresión del mensajero de MMP-9 y NURR1 en pacientes con LLC y MEC-1, presentando una relación dosis-dependiente al fármaco.

La expresión de MMP-9 contrario a los esperado mostraba mayor inducción, lo que nos dirige a un panorama diferente en el que se describe que esta enzima genera resistencia ante agentes antitumorales. Ya que esta asociada como antagonista de algunos fármacos como la fludarabina empleada para el tratamiento de la LLC (Amigo, 2015).

MMP-9 como otras MMPs, pueden desempeñar doble funciones ya sea como proapoptótico o antiapoptótico (Ramón de la Fata et al, 2013), lo que nos lleva a dilucidar que tanto MLN4924, Ly294002, IL-1 $\beta$ , Bortezomib y Forskolina inducen a MMP-9 favoreciendo el proceso proapoptótico, y este mecanismo no se puede describir si esta directamente relacionado con NF-kB, AP-1 ni NURR1, dado que los niveles de expresión de Mcl-1, Bcl-2, NURR1, Tank, Bcl-xl y Xiap y NURR1 incrementaban al igual que MMP-9.

Por lo tanto, el papel de MLN4924 como inhibidor de la NEDDilación a través de la ruta NF-kB en este modelo no podría ser esclarecido, debido a los niveles de expresión de los principales genes involucrados en esta ruta Mcl-1, Bcl-2, NURR1, Tank, Bcl-xl y Xiap están inducidos contrario al efecto esperado con la inhibición de la NEDDilación. Por lo que, es necesario considerar la capacidad de MMP-9 para modular la inhibición o la inducción de la expresión en respuesta a agentes terapéuticos, a través de la modulación del balance entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos, manteniendo así su papel dual en la apoptosis (Amigo, 2015; Manuello et al, 2005). Un razonamiento alternativo es que MMP-9 actúa como antagonista a la respuesta apoptótica a compuestos citotóxicos, dando paso a un mecanismo compensatorio. Varias investigaciones han descrito previamente este mecanismo compensatorio o de inducción

de supervivencia a través de MMP-9 en diferentes tipos de cáncer. En carcinoma de mama y melanoma, la inhibición de MMP-9 y MMP-2 aumenta la apoptosis mediada por ligandos de receptores de la familia de TNFR (Nyormoi et al., 2003). De igual manera un estudio en murinos de xenotransplante, frente al tratamiento con Paclitaxel en células de carcinoma de pulmón incrementaba la expresión de MMP-9 y la metástasis, este efecto era contrarrestado con un inhibidor de MMP-9 (Gingis-Velitski et al, 2011).

En el estudio del efecto de la interacción de las células MEC-1 con las células HS5 sobre la expresión de MMP-9 y el rol de la NEDDilación se evidenció que el cocultivo indujo la expresión de MMP-9 en las células MEC-1, lo que no se observó con la expresión de NURR1. Sin embargo, la aplicación tanto de MLN4924 y Bortezomib en el cocultivo revirtieron la inducción de MMP-9, lo que resulta interesante, ya que en cultivo único de MEC-1 no se obtuvo el mismo efecto con la inhibición de la NEDDilación ni de NF-kB. Siendo relevante continuar en este sentido el estudio del efecto de la NEDDilación en la interacción de las células MEC-1 con células del estroma. Por lo que, las evidencias sugieren que las células del estroma son parte integral del microambiente de la LLC. Además, la interacción entre las células de la LLC y las células accesorias en el microambiente podría potenciar la expresión de proteínas antiapoptóticas como MCL-1 implicadas en la ruta NF-kB, sobre la cual hay fuertes evidencias que actúa la NEDDilación (Kipps et al, 2017).

En resumen, en este estudio estuvo enfocado el efecto inhibitorio del MLN4924 sobre MMP-9, a la vez que se emplearon inhibidores como herramientas con el fin de determinar el papel de rutas de NF-kB y PI3K entorno a la NEDDilación. Sin embargo, el nivel de expresión de MMP-9 incrementaba en dependencia a la dosis del inhibidor, por lo que se descartó su carácter antiapoptótico. Otro importante punto, es que al igual que la expresión de MMP-9 se incrementaron los niveles de expresión de Mcl-1, Bcl-2, NURR1, Tank, Bcl-xl y Xiap y NURR1 dianas de NF-kB y AP-1 respectivamente, lo que sugiere que el incremento de la expresión puede estar mediada por estas vías en las células MEC-1. Por otro lado, el efecto de la interacción entre MEC-1 y células HS5 indujo la expresión de MMP-9. No obstante, el tratamiento con MLN4924 y bortezomib reprimió la expresión de MMP-9 siendo relevante ya que este efecto no se pudo observar previamente en cultivos de MEC-1 en presencia de estos inhibidores.

## CONCLUSIONES

- MLN4924, Ly294002, Bortezomib, IL-1 $\beta$  y Forskolina incrementan la expresión de MMP-9 en células MEC-1, mostrando un posible el carácter proapoptótico de MMP-9.
- La sobreexpresión de Mcl-1, Bcl-2, NURR1, Tank, Bcl-xl y Xiap tanto como MMP-9, muestran que NF-kB y API estarían involucrados en la modulación de MMP-9 en las células MEC-1.
- El cocultivo de las células MEC-1 y células del estroma (HS5) induce la expresión de MMP-9, sin embargo, el tratamiento con MLN4924 y Bortezomib revierten este efecto sobre MMP-9.
- Los datos obtenidos en la línea celular MEC-1 al respecto de la modulación de la expresión de MMP-9 por la NEDDilación contrastan con los previamente obtenidos en linfocitos primarios B-LLC. Presumiblemente, la transformación promielocítica de la que derivan ha afectado a estos procesos, por lo que se concluye que no son un buen modelo de LLC en este sentido.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis hermanas Carlita y Gaby que son el pilar de mi vida y a mis padres que han sido mi mayor ejemplo de perseverancia y amor para alcanzar mis metas.

## REFERENCIAS

- Alpay, M., Yurdakok-Dikmen, B., Kismali, G., Sel, T. (2016). Antileukemic effects of piperlongumine and alpha lipoic acid combination on Jurkat, MEC1 and NB4 cells in vitro. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), 556-560. DOI: 10.4103/0973-1482.151936.
- Amigo, M. (2015). Papel de microambiente en la respuesta de células de leucemia linfocítica crónica a trióxido de arsénico: mecanismos de resistencia. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Arranza, L., del Mar Arriero, M., Villatoro, A. (2017). Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. *Blood Review*, 31(5), 306-317. DOI: 10.1016/j.blre.2017.05.001.
- Baud, V., Karin, M. (2009). Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Review*, 8, 33-40. DOI: 10.1038/nrd2781.
- Bauvois, B., Dumont, J., Mathiot, C., Kolb, J. (2002). Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia*, 16, 791-798. DOI: 10.1038/sj/leu/2402472.
- Bertaina, A., Vinti, L., Strocchio, L., Gaspari, S., Caruso, R., Algeri, M., Coletti, V., Gurnari, C., Romano, M., Giuseppina, M., Girardi, K., Trevisan, V., Bertaina, V., Merli, P., Locatelli, F. (2017). The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Hematology*, 176(4), 629-636. DOI: 10.1111/bjh.14505.
- Byrd, J., Stilgenbauer, S., Flinn, I. (2004). Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology*, 1, 163-183. DOI: 10.1182/asheducation-2004.1.163.
- Calaharis-Cappio, F. (1997). Relationship between autoimmunity and immunodeficiency in CLL. *Hematol Cell Ther*. 39, pp S13-S16. PMID: 9471057.
- Chiorazzi, N., Rai, K., Ferrarini, M. (2005). Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 352, 804-15. DOI:10.1056/NEJMra041720.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J., Certo, M., Love, T., Novina, C., Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 112-121. DOI: 10.1172/JCI28281.
- Dinarello, C. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immuno Rev*, 281(1), 8-27. DOI: 10.1111/imr.12621.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, X. (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 446(5), 475-482. DOI:10.1007/s00428-005-1264-9.

- Dovin, L. (2018). Participación del metabolismo de los esfingolípidos en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161–174. DOI:10.1038/nrc745
- García-Morales, V., Luaces-Regueira, M., Campos-Toimil, M. (2017). The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 145, 94–101. DOI:10.1016/j.bcp.2017.09.004
- Gingis-Velitski, S., Loven, D., Benayoun, L., Munster, M., Bril, R., Voloshin, T., Alishekevitz, D., Bertolin, F., Shaked, Y. (2011). Host Response to Short-term, Single-Agent Chemotherapy Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Accelerates Metastasis in Mice. *Cancer Research*, 71(22), 6986–6996. DOI:10.1158/0008-5472.can-11-0629.
- Godbersen, J., Paiva, C., Danilova, O., Berger, A., Brown, J., & Danilov, A. (2015). Targeting neddylation effectively antagonizes nuclear factor- $\kappa$ B in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leukemia & Lymphoma*, 56(5), 1566–1569. DOI:10.3109/10428194.2014.990901.
- Hallek, M., Cheson, B., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Rai, K., Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12), 5446–5456. DOI:10.1182/blood-2007-06-093906.
- Heidari N, Abroun S, Bertacchini J, Vosoughi T, Rahim F, Saki N. (2017). Significance of inactivated genes in leukemia: pathogenesis and prognosis. *Cell J*, 19(9), 9-26. DOI: 10.22074/cellj.2017.4908.
- Hernández-Flórez, D., Valor, L. (2016). Los inhibidores de las proteínas-cinasas en enfermedades autoinmunes e inflamatorias: presente y futuro de nuevas dianas terapéuticas. *Reumatología Clínica*, 12(2), 91–99. DOI:10.1016/j.reuma.2015.06.004
- Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., Dick, L., Kurz, T. (2012). Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochemical Journal*, 441(3), 927–939. DOI:10.1042/bj20111671.
- Kay, N., Hamblin, T., Jelinek, D., Dewald, G., Byrd, J., Farag, Lucas, M., Lin, T. (2002). Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology*, 2002(1), 193–213. DOI:10.1182/asheducation-2002.1.193.
- Kipps, T., Stevenson, F., Wu, C., Croce, C., Packham, G., Wierda, W., O'Brien, S., Gribben, J., Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 16096. DOI:10.1038/nrdp.2016.96.
- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C., Rai, K., Hines, J., Reed, J. (1998). Expression of Apoptosis-

- Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations With In Vitro and In Vivo Chemoresponses. *Blood*, 91(9), pp 3379-3389. DOI: 0006-4971/98/9109-001.
- Kumar, A., Collins, M., Scholefield, H., Watson, A. (2000). Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer*, 82(4), 960-965. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1025.
- Landgren, O., Albitar, M., Ma, W., Abbasi, F., Hayes, R., Ghia, P., Marti, G., Caporaso, N. (2009). B-Cell Clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 659–667. DOI:10.1056/nejmoa0806122.
- Lin, W., Hou, C., Shen, C., Juan, H., Ko, H., Wang, M., Chen, C. (2008). Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 29(9), 1807–1815. DOI:10.1093/carcin/bgn162
- Lopez-Guerra, M., & Colomer, D. (2010). NF-κB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(3), 275–288. DOI:10.1517/14728221003598930.
- Mannello, F., Luchetti, F., Falcieri, E., & Papa, S. (2005). Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis*, 10(1), 19–24. DOI:10.1007/s10495-005-6058-7
- McEvoy, N., Murphy, A., Ponnio, T., Conneely, M., Bresnihan, B., FitzGerald, O., Murphy, E. P. (2002). Activation of Nuclear Orphan Receptor NURR1 Transcription by NF- B and Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *The Journal of Immunology*, 168(6), 2979–2987. DOI:10.4049/jimmunol.168.6.2979.
- Messinger, Y., Gaynon, S., Spoto, R., van der Giessen, J., Eckroth, E., Malvar, J., Bostrom, B. (2012). Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Blood*, 120(2), 285-290. DOI:10.1182/blood-2012-04-418640.
- Mix, K. S., Attur, M. G., Al-Mussawir, H., Abramson, S. B., Brinckerhoff, C. E., & Murphy, E. P. (2007). Transcriptional Repression of Matrix Metalloproteinase Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor NURR1 in Cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9492–9504. DOI:10.1074/jbc.m608327200.
- Moon, E., Lerner, A. (2003). PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2<sup>a</sup>. *Blood*, 101(10), 4122-4130. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3208.
- Moon, E., Lee, R., Near, r., Weintraub, L., Wolda, S., Lerner, A. (2002). Inhibition of PDE3B Augments PDE4 Inhibitor-induced Apoptosis in a Subset of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 8(2), 589-595.

- Motta, M., Wierda, W., Ferrajoli, A. (2009). Chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 115(17), 3830–3841. DOI:10.1002/cncr.24479.
- Nyormoi, O., Mills, L., & Bar-Eli, M. (2003). An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death & Differentiation*, 10(5), 558–569. DOI:10.1038/sj.cdd.4401209
- Ram, M., Sherer, Y., & Shoenfeld, Y. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases. *Journal of Clinical Immunology*, 26(4), 299–307. DOI:10.1007/s10875-006-9022-6.
- Ramón de Fata, F., Ferruelo, A., Andrés, G., Gimbernat, H., Sánchez-Chapado, M., Angulo, C. (2013). The role of matrix metalloproteinase MMP-9 and TIMP-2 tissue inhibitor of metalloproteinases as serum markers of bladder cancer. *Actas Urológicas Españolas*, 37(8), 480-488. DOI:10.1016/j.acuroe.2013.05.002.
- Rasul, E., Salamon, D., Nagy, N., Leveau, B., Banati, F., Szenthe, K., Koroknai, A., Minarovits, J., Klein, G., Klein, E. (2014). The MEC1 and MEC2 Lines Represent Two CLL Subclones in Different Stages of Progression towards Prolymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, 9(8), e106008. DOI:10.1371/journal.pone.0106008.
- Rawstron, A., Bennett, F., O'Connor, S., Kwok, M., Fenton, J., Plummer, M., Tute, R., Owen, R., Richards, S., Jack, A., Hillmen, P. (2008). Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 359(6), 575–583. DOI:10.1056/nejmoa075290.
- Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., Frossard, N. (2009). Ser276 Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by MSK1 Controls SCF Expression in Inflammation. *PLoS ONE*, 4(2), e4393. DOI:10.1371/journal.pone.0004393.
- Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M. J., Garcia-Marco, J. A., & Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by 4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*, 108(9), 3143–3151. DOI:10.1182/blood-2006-03-007294.
- Redondo-Muños, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M., Van den Steen, P., Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., García-Marco, J., García-Pardo, A. (2010). Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival through Its Hemopexin Domain. *Cancer Cell*, 17, 160-172. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.044.
- Ringshausen, I., Dechow, T., Schneller, F., Weick, K., Oelsner, M., Peschel, C., & Decker, T. (2004). Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 18(12), 1964–1970. DOI:10.1038/sj.leu.2403544.

- Roos-Weil, D., Nguyen-Khac, F., Bernard, O. (2016). Chronic lymphocytic leukemia: Time to go past genomics?. *American Journal of Hematology*, 91(5), 518–528. DOI:10.1002/ajh.24301.
- She, B., Chandarlapaty, Q., Lobo, J., Haskell, M., Leander, R. DeFeo-Jones, D., Hube, H., Rosen, N. (2008). Breast Tumor Cells with PI3K Mutation or HER2 Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. *PLoS ONE*, 3(8), e3065. DOI:10.1371/journal.pone.0003065.
- Soucy, T. A., Dick, L. R., Smith, P. G., Milhollen, M. A., Brownell, J. E. (2010). The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes & Cancer*, 1(7), 708–716. DOI:10.1177/1947601910382898.
- Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K., Caligaris-Cappio, F. (1999). MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia Research*, 23(2), 127–136. DOI:10.1016/s0145-2126(98)00154-4.
- Stevenson, F., Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103(12), 4389–4395. DOI:10.1182/blood-2003-12-4312.
- Tandon, A., Sinha, S. (2011). Structural insights into the binding of MMP9 inhibitors. *Bioinformatics*, 5(8), 310-314. PMID: 21383916.
- Vladimirova, R., Popova, D., Vikentieva, E., Guenova, M. (2015). Chronic Lymphocytic Leukemia -Microenvironment and B Cells. *Intech*, 9, 247-276. DOI:10.5772/60761.
- Wang, Y., Kuramitsu, Y., Baron, B., Kitagawa, T., Tokuda, K., Akada, J., Maehara, S., Maehara, Y., Nakamura, K. (2016). PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(2), 606–612. DOI:10.3892/ijo.2016.3804.
- Xirodimas, D. (2008). Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochemical Society Transactions*, 36(5), 802-806. DOI:10.1042/BST0360802.
- Zhang, Y., Shi, C., Zhang, H., Li, G., Li, S. (2016). MLN4924 suppresses neddylation and induces cell cycle arrest, senescence, and apoptosis in human osteosarcoma. *Oncotarget*, 7(29), 45263- . DOI: 10.18632/oncotarget.9481.